

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860168

研究課題名(和文)FIH阻害を利用したHIF制御:選択的低分子FIH阻害薬の開発

研究課題名(英文)Activation of HIF by inhibiting FIH: the development of novel organic molecules inhibiting FIH selectively

研究代表者

川口 真一 (Kawaguchi, Shin-ichi)

佐賀大学・農学部・特任助教

研究者番号：00722894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転写因子であるHIF(低酸素誘導因子)を活性化することにより、虚血性疾患治療に有効である先行研究のもと、HIFを穏やかに活性化するタンパク質としてFIH(Factor Inhibiting HIF)に着目し、研究を行ってきた。コンピューターによるドッキングシミュレーションによって未知化合物である分子を設計し、実際に約70種類の新規低分子化合物の合成を行った。合成した化合物を、細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイによる評価系を用いて、HIFの活性化評価を行った。その結果、いくつかの化合物でHIFを活性化するという結果を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the exploration of novel organic molecules inhibiting FIH (Factor Inhibiting HIF) was conducted because previous studies shows that HIF (hypoxia inducible factor: transcription factor) can be gently activated by inhibiting FIH. The gentle activation of HIF is effective for the treatment of ischemic disease. The research group synthesized about 70 compounds and a few compounds of them induced gentle activation of HIF.

研究分野：創薬化学

キーワード：HIF 低酸素誘導因子 FIH 低分子阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor, HIF) は、生体組織において低酸素環境下で発現誘導する転写因子である。HIF は赤血球産生、血管新生、グルコース代謝、細胞増殖促進に関与する遺伝子群を統一的に誘導する。HIF の制御は、虚血性疾患の制御につながるために重要な課題である。具体例として、慢性腎臓病患者が呈する慢性虚血症状に対し、HIF を一過的に活性化し赤血球産生を促し、症状の緩和が試みられている。HIF は、通常酸素状態では PHD (Prolyl Hydroxylase Domain-containing protein) によって水酸化され、その水酸化された HIF がユビキチン-プロテアソームシステムによる分解を受け、負に制御されることが知られている。(図1) そこで、この経路において PHD を低分子阻害剤によって阻害することで HIF を正に制御する試みが近年精力的に研究されている。しかし、PHD を阻害することの弊害も報告されている。すなわち、PHD には PHD1、PHD2、PHD3 の3つのアイソフォームが知られているが (PHDs と表記)、PHDs のそれぞれのノックアウトマウスの研究によると PHD2 のノックアウトマウスでは多血症となり、胎生致死となることが報告されている。PHD1 や3のノックアウトマウスでは赤血球産生の促進や血管新生の促進は見られるものの、生命維持を脅かすような重篤な症状は見られなかった。このような知見から、PHDs に対して選択的な阻害剤の開発が求められているが、PHDs は、活性中心の構造が酷似しているために、PHDs に対する選択的な阻害剤の開発は難航している。

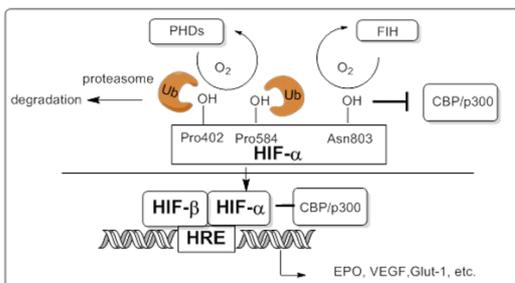


図1. HIF の関係する主な経路 1) HIF は、HIF- $\alpha$  と HIF- $\beta$  の2種類に分類される。2) HIF- $\alpha$  は通常酸素状態では、PHDs によって水酸化され、その水酸化された HIF- $\alpha$  は VHL (Von Hippel-Lindau) タンパクにより認識され、ユビキチン-プロテアソームシステムによる分解を受ける。3) HIF- $\alpha$  は通常酸素状態では、FIH によっても水酸化され、CBP や P300 と結合できなくなる。4) 分解を免れた HIF- $\alpha$  は細胞核内に移動し、HIF- $\beta$  と結合することで DNA 上の HRE (低酸素応答領域) に作用し、EPO、VEGF、Glut-1 などの遺伝子発現を誘導する。その際、CBP/p300 と HIF- $\alpha$  が結合することにより、遺伝子の転写が促進される。

## 2. 研究の目的

申請者の研究グループでは HIF を制御することのできるタンパク質として FIH (Factor Inhibiting HIF) に着目した。

FIH は、HIF1- の 803 番目のアスパラギン残基を水酸化するタンパク質である。水酸化されない場合、転写補助活性化因子である

CBP や P300 と結合することで HIF の下流にある EPO (赤血球産生ホルモン)、VEGF (血管内皮細胞増殖因子)、Glut-1 (糖輸送タンパク) などの遺伝子発現を促進する。このように FIH は HIF を制御する重要な因子であるが直接 HIF の分解に関わることが無いために注目度は低く、FIH 阻害剤による HIF の制御に関する研究はほとんどされていない。一方で、FIH ノックダウン細胞を用いた研究から、FIH をノックダウンすることで HIF の下流にある VEGF、Glut-1、PHD3、CA9 (Carbonic Anhydrase9) などの発現が亢進することが知られていることから、FIH 阻害剤による HIF の制御は十分に可能であると考えられる。また、FIH 遺伝子欠損マウスもすでに作成されており、HIF の活性化を介して代謝が活性化され、太りにくいということが報告されている。これらの先行研究に基づいて、本研究では新規低分子化合物による FIH 阻害剤を開発する。そして、FIH 阻害が HIF の活性化に効果的であるかについて検討する基礎研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) FIH 阻害化合物の設計について

FIH は蛋白 X 線結晶構造がすでに知られているので、その構造をもとに in silico で FIH に選択的に阻害する新規化合物をドッキングシミュレーションによって設計する。FIH が機能を果たすためには 2-oxoglutarate (2OG) が鉄原子に配位することが必要である。2OG と拮抗阻害が可能な化合物を設計する。

### (2) 設計した化合物の合成について

設計した化合物の類縁化合物を数多く合成する。合成時の工夫については遷移金属触媒クロスカップリング反応などを利用し、従来、最終生成物の数だけあった合成中間体を共通の骨格を使用できるように工夫する。

### (3) 活性評価について

たくさんの化合物を迅速に評価するために、細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイによって評価を行う。HIF の下流に位置する遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法などの分子生物学的手法を用いて解析する。毒性については、MTS assay を用いて評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 化合物の設計

FIH は活性中心に Fe 原子を有し、これは 2 つの His 残基および Asp 残基によって保持されている。FIH が機能を果たすためには 2-oxoglutarate (2OG) が鉄原子に配位することが必要である。本研究では、2OG と競合するアンタゴニストとして作用する骨格を設計した。(図2) すなわち、FIH の活性中心である Fe に 2 座配位することができ、かつリジン 214 残基およびチロシン 145 残基と水素結合できるようにカルボニルから 2 元

素挟みカルボン酸を配置した。Fe への 2 座の配座部分は 2-carboxylfuran または 2-carboxylthiophene とした。furan および thiophene の 5 位、4 位をそれぞれ R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> とし、フェニル基やメチル基を有するものを合成した。また、R<sup>3</sup> 部分はアミノ酸の側鎖部分に相当する。合成に用いたアミノ酸はグリシン、アラニン、フェニルアラニン(D および L 体)、トリプトファン(D および L 体)、チロシンである。R<sup>4</sup> は脂溶性を高めるために Me 基や Et 基を導入したものを想定した。設計した化合物は、コンピューターを用いてドッキングシミュレーションを行い、その設計の妥当性について評価した。例として図 3 に一例を示す。

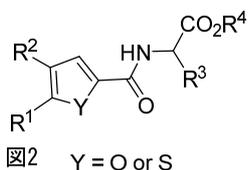
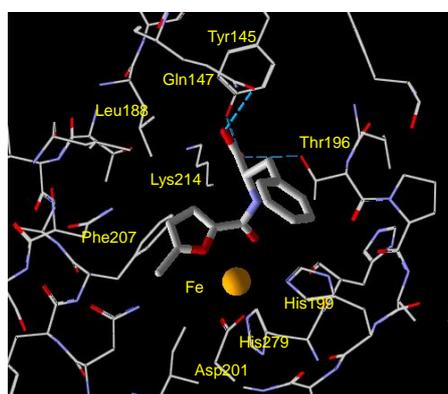


図 3

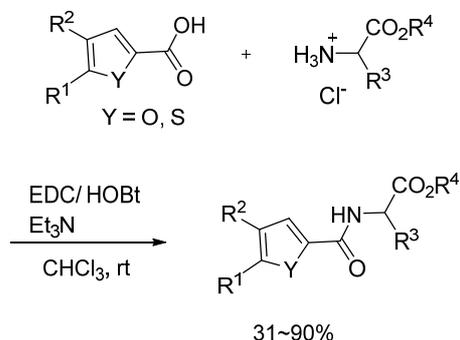


シミュレーションによるドッキング予測によると設計した化合物は FIH の活性中心の空孔に収まることが示された。

## (2) 化合物の合成

設計した化合物であるすべての 2-carboxylfuran または 2-carboxylthiophene 誘導体は対応する furan または thiophene carboxylic acid とアミノ酸エステル塩酸塩との縮合反応により合成した。(Scheme 1)

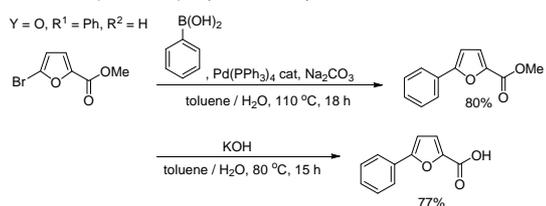
Scheme 1. Condensation reactions



アミノ酸エステル塩酸塩はすべて購入したものをを用いた。無置換 furan および thiophene carboxylic acid、benzofuran およ

び benzothiophene carboxylic acid は購入したものをを用いた。その他の置換 furan および thiophene carboxylic acid は Scheme 2-4 に示すように合成した。Scheme 2 では 5 位にフェニル基を有する furan carboxylic acid の合成方法を示す。

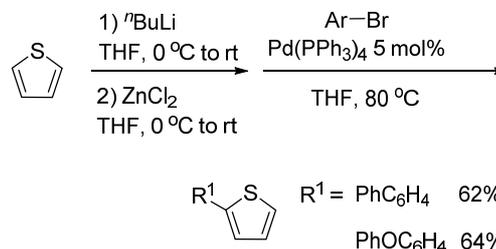
Scheme 2. Preparation of 5-phenylfuran-2-carboxylic acid



2-arylthiophene は thiophene と ArB(OH)<sub>2</sub> の鈴木宮浦カップリング反応によって合成した (Scheme 3)

Scheme 3. Preparation of 2-arylthiophene

Y = S, R<sup>1</sup> = PhC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> or PhOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R<sup>2</sup> = H

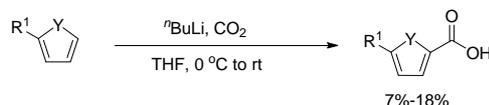


また、更に 2 位置換 thiophene や furan をリチオ化した後 CO<sub>2</sub> 雰囲気下にする事でカルボキシル基を低収率ながら導入することが可能であった (Scheme 4)

Scheme 4. Preparation of 5-substituted thiophene-2-carboxylic acid

Y = S, R<sup>1</sup> = PhC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, PhOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, Ph, or Me, R<sup>2</sup> = H

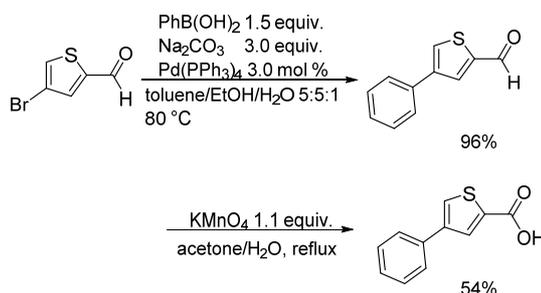
Y = O, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = H



4 位置換 2-carboxylthiophene の合成は 4-bromothiophene-2-carbaldehyde を出発原料とし、PhB(OH)<sub>2</sub> とカップリング反応を行った後、酸化することで達成された (Scheme 5)

Scheme 5. Preparation of 4-phenylthiophene-2-carboxylic acid

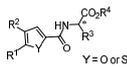
Y = S, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Ph



### (3) 化合物の評価

化合物は約70種類ほど合成し、ルシフェラーゼアッセイによる活性評価を行った。その中で、抜粋し表1に示す。

表1. ルシフェラーゼアッセイによる HIF 活性化評価



entry	compound No.	Y	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	configuration	25% activity <sup>a</sup>	100 μM activity <sup>b</sup>	toxicity <sup>c</sup> IC <sub>50</sub>	clogP
1	1	O	H	H	H	Me	-	25 μM	20%	>100 μM	0.04
2	2	S	H	H	H	Me	-	ND	0%	>100 μM	0.70
3	3	O	H	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	S	ND	0%	>100 μM	1.03
4	4	O	H	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	R	ND	0%	>100 μM	1.03
5	5	S	H	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	S	ND	0%	>100 μM	2.39
6	6	S	H	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	R	ND	0%	>100 μM	2.39
7	7	O	Me	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	Me	S	25 μM	22%	>100 μM	1.82
8	8	O	Me	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	Me	R	ND	2%	>100 μM	1.82
9	9	O	Me	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	S	25 μM	22%	>100 μM	1.37
10	10	O	Me	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	R	6.3 μM	0%	>100 μM	0.49
11	11	S	Me	H	H	H	-	25 μM	23%	>100 μM	1.37
12	12	S	Me	H	Me	H	S	ND	18%	>100 μM	1.25
13	13	S	Me	H	Me	Et	S	ND	0%	>100 μM	1.85
14	14	S	Me	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	Me	R	ND	0%	>100 μM	3.19
15	15	S	Me	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	Et	S	25 μM	12%	>100 μM	3.53
16	16	S	Me	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	H	R	100 μM	30%	>100 μM	2.47
17	17	S	Me	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Et	S	100 μM	49%	>100 μM	3.07
18	18	S	Me	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Et	R	100 μM	52%	>100 μM	3.07
19	19	O	Ph	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	H	S	ND	0%	>100 μM	2.96
20	20	O	Ph	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	Me	S	ND	10%	>100 μM	3.22
21	21	S	Ph	H	Me	H	S	ND	0%	>100 μM	2.65
22	22	S	Ph	H	Me	Et	S	ND	16%	>100 μM	3.25
23	23	S	Ph	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	H	S	ND	0%	>100 μM	4.32
24	24	S	Ph	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	Me	S	ND	7%	>100 μM	4.58
25	25	S	Ph	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	S	ND	0%	>100 μM	4.13
26	26	S	H	Ph	H	Me	-	ND	0%	>100 μM	2.36
27	27	S	H	Ph	-CH <sub>2</sub> -Ph	Et	S	ND	2%	>100 μM	4.87
28	28	S	H	Ph	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	S	25 μM	0%	>100 μM	4.07
29	29	S	H	Ph	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	R	ND	0%	>100 μM	4.07
30	30	S	H	Ph	-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH	Me	S	6.3 μM	0%	75 μM	4.14
31	31	S	4-Ph-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	Me	-	ND	0%	>100 μM	4.09
32	32	S	4-Ph-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	Et	S	ND	0%	>100 μM	6.60
33	33	S	4-Ph-O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	Me	-	ND	0%	>100 μM	3.96
34	34	S	4-Ph-O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	Me	Me	S	ND	0%	>100 μM	4.45
35	35	S	4-Ph-O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	-CH <sub>2</sub> -Ph	Et	S	ND	0%	>100 μM	6.12
36	36	S	4-Ph-O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	-CH <sub>2</sub> -3-indolyl	Me	S	ND	0%	>100 μM	5.66

表に挙げている化合物の中で10種ほどの化合物がHIF活性を示したが、特に化合物9が、活性が強く、低用量で活性を示し、かつ細胞毒性を示さなかった。その構造を図4に示す。また、ヒト神経芽細胞(SKN BE2C)を化合物9(100 μM)で刺激すると、HIF下流遺伝子であるCA9の発現が亢進した。(図5)このように、FIHを阻害することにより、穏やかにHIFを活性化すること低分子化合物9を見いだした。

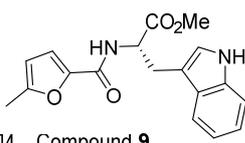
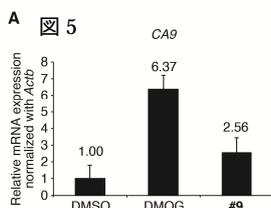


図4 Compound 9



### 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4件)

Kawaguchi, S-i.; Saga, Y.; Sato, Y.; Minamida, Y.; Nomoto, A.; Ogawa, A., *P-Fluorous Phosphines as Electron-Poor/Fluorous Hybrid Functional Ligands for Precious Metal Catalysts: Synthesis*

of Rh(I), Ir(I), Pt(II), and Au(I) Complexes Bearing *P*-Fluorous Phosphine Ligands(査読有) *Inorganics* **2017**, *5*, 5. DOI: 10.3390/inorganics5010005

Sato, Y.; Kawaguchi, S-i.; Nomoto, A.; Ogawa, A. Highly Selective Phosphinylphosphination of Alkenes with Tetraphenyldiphosphine Monoxide, (査読有) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (33), 9700-9703. DOI: org/10.1002/anie.201603860.

Tsujita, T.; Baird, L.; Furusawa, Y.; Katsuoka, F.; Hou, Y.; Gotoh, S.; Kawaguchi, S-i.; Yamamoto, M. Discovery of an NRF1-specific inducer from a large-scale chemical library using a direct NRF1-protein monitoring system. (査読有) *Genes to Cells* **2015**, *20*, (7) 563-577. DOI: 10.1111/gtc.12248

Tsujita, T.; Kawaguchi, S-i.; Dan, T.; Baird, L.; Miyata, T.; Yamamoto, M., Hypoxia-Sensitive Reporter System for High-Throughput Screening.(査読有) *Tohoku J. Exp. Med.* **2015**, *235* (2), 151-159. DOI: org/10.1620/tjem.235.151

[学会発表](計3件)

1. 川口真一・辻田忠志・小川昭弥・宮田敏男“2-カルボニルフラン誘導体によるHIFの活性化およびその活性化経路の検討”, 第89回日本生化学会大会, 2P-173, 仙台, 2016年, 9月25-27日
2. 川口真一・辻田忠志・宮田敏男・小川昭弥“HIF(低酸素誘導因子)活性化剤の設計と合成およびその活性評価”第40回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム in 鹿児島, 指宿ペイテラス2016年, 8月26-28日
3. 川口真一・辻田忠志・宮田敏男・小川昭弥“フランおよびチオフェン-2-カルボニルアミノ酸誘導体によるfactor of inhibiting HIF(FIH)阻害”, 第13回がんハイポキシア研究会シンポジウム, P-9, 国立遺伝学研究所, 2015年6月5-6日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.aic.ag.saga-u.ac.jp/karatsu/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川口 真一 (KAWAGUCHI, Shin-ichi)

佐賀大学・農学部・特任助教

研究者番号：00722894