

論文の内容の要旨

論文題目

マルチ創薬テンプレート手法の有用性の実験的実証 ～新規生理活性物質の創出と選択性の付与～

氏名 本島 和典

【第1章 研究背景】

マルチ創薬テンプレート手法とは、ヒト生体内には5-7万種のタンパク質が存在する一方で、それらの化学的性質を無視した三次元的立体構造（フォールド構造）の数は約1000種と数に限りがあることに着目した生理活性物質創出法である。当研究室ではサリドマイド (Figure 1) をマルチ創薬テンプレートとして用い、構造修飾を行うことにより、多岐に渡る生理活性物質の創製に成功している。しかし、リード化合物であるサリドマイドがマルチターゲットなものであることから、見出した化合物のタンパク質間の選択性が問われることもあった。そこで私はマルチ創薬テンプレート手法の生理活性物質創出における有用性を実証すべく、標的疾患に糖尿病を選択し、新規生理活性物質の創製に加え、各種タンパク質に対する選択的リガンドの創製を目指すことにした。

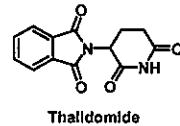


Figure 1. サリドマイド

【第2章 LXR アンタゴニスト活性と α -glucosidase 阻害活性の作用分離、LXR α 選択的アンタゴニストの創製】

当研究室ではサリドマイドを構造展開することにより、 α -glucosidase 阻害活性と LXR アンタゴニスト作用を併せ持つ PP2P を創出している。 α -glucosidase は糖の α -グリコシド結合の加水分解を触媒する酵素である。一方、LXR は核内受容体スーパーファミリーの1つであり、 α 、 β の2つのサブタイプが存在し、コレステロールや糖のホメオスタシスに関わっている。近年多くの LXR リガンドの開発が行われているが、既存の LXR アゴニストの副作用として血中トリグリセリド (TG) 濃度の上昇が問題となっている。そのような中、血中 TG 濃度の上昇は LXR α の寄与が大きいという報告がなされた。LXR の更なる機能解明、および血中 TG 濃度上昇の回避のために LXR α 選択的アンタゴニストが必要であると考え

られる。そこでまず PP2P をリードとして α -glucosidase 阻害活性と LXR 活性の作用分離、そして LXR α 選択的アンタゴニストの創製を目指した。

PP2P と同様に α -glucosidase 阻害活性と LXR 活性を併せ持つ化合物として riccardin C が知られている。そこで私は PP2P と riccardin C との間に共通部分構造が存在するのではないかと考え、phenethylphenyl phthalimide (PPP) 骨格をデザインし、種々誘導体を合成した (Figure 2)。

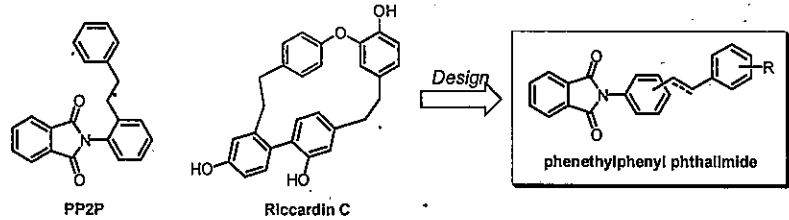


Figure 2. phenethylphenyl phthalimide 骨格のデザイン

その結果、LXR α 選択的アンタゴニスト (1) および LXR 選択的アンタゴニスト (2, 3)、 α -glucosidase 選択的阻害剤 (4, 5) の創製に成功した (Figure 3)。

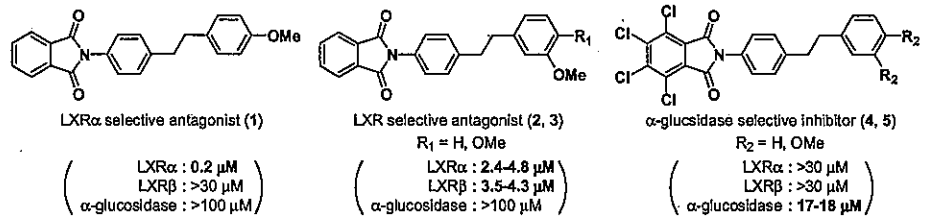


Figure 3. LXR α 選択的アンタゴニスト、LXR 選択的アンタゴニスト、 α -glucosidase 選択的阻害剤

【第3章 Glycogen phosphorylase 阻害剤の創製】

Glycogen phosphorylase (GP) は肝臓に貯蔵されている glycogen から glucose-1-phosphate を遊離させる酵素であり、高血糖症の治療標的として考えられている。そこで、 α -glucosidase、LXR と同様に糖を認識する酵素である GP に対して α -glucosidase 阻害活性と LXR 活性を併せ持つ PPP 誘導体が活性を示すのではないかと考え、これまでに見出した PPP 骨格を有する化合物の GP 阻害活性を評価した。その結果、化合物 6 にポジコンである DAB の約 40 倍の高活性が認められた (Figure 4)。

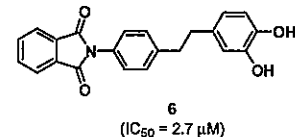


Figure 4. GP 阻害剤 6.

【第4章 DPP-IV 阻害剤の創製】

Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) はインスリン分泌を促進する glucagon-like peptide 1 を分解する酵素であることから、DPP-IV 阻害剤は抗糖尿病薬として期待されている。当研究室ではこれまでにサリドマイドの構造展開により phthalimide 骨格を有する DPP-IV 阻害剤 PPS-33、5APP-33 を見出している (Figure 5)。また、PPS-33 は弱い DPP-IV 阻害活性以外にも α -glucosidase 阻害活性、LXR アンタゴニスト活性、5APP-33 は α -glucosidase 阻害活性を有している。そこで、先に創製した PPP 誘導体も LXR アンタゴニスト活性と α -glucosidase 阻害活性を有し

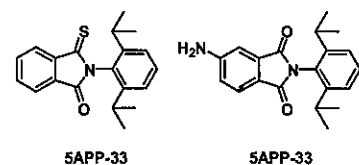


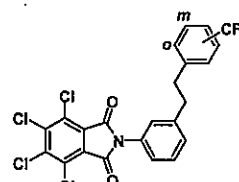
Figure 5. PPS-33 と 5APP-33

ていることから、これらの中に DPP-IV に対しても阻害活性を示す化合物が存在すると考えた。

PPP 誘導体からスクリーニング、構造展開を行ったところ、強力な DPP-IV 阻害活性を有する 7、8 の創出に成功した (Table 1)。また、活性が認められた PPP 誘導体について Lineweaver-Burk plot を行ったところ、阻害様式は非競合であることが明らかとなった。

DPP-IV と同じファミリーに属する DPP-8 はその阻害により脱毛、血小板減少などの副作用が生じることが知られている。従って DPP-IV 阻害剤開発においては DPP-8 との選択性が重要となる。DPP-IV と DPP-8 は活性中心のアミノ酸はほぼ一致している。その一方で全体のホモロジーは 50%程度であることから、非競合阻害は選択性の獲得の手段として有用と考えられる。そこで DPP-VIII 阻害活性を評価したところ、化合物 7 において DPP-8 阻害活性は弱く、DPP-IV 選択性が認められた (Table 1)。

Table 1 DPP-IV 阻害剤 7,8

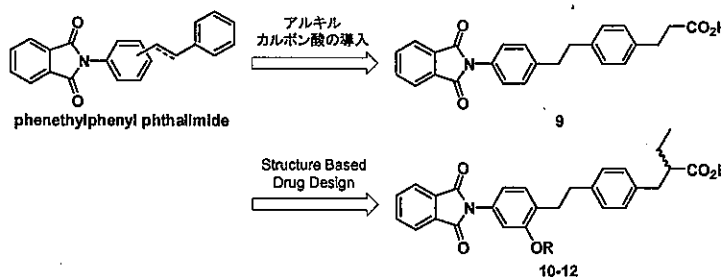


Compound	position	Inhibition ratio at 10 μM (IC ₅₀ [μM])	
		DPP-IV	DPP-8
7	meta	86% (3.1 μM)	23% (>30 μM)
8	ortho	87% (4.0 μM)	43% (11 μM)

【第5章 PPAR リガンドの創製】

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) は核内受容体スーパーファミリーの 1 つであり、α、δ、γ の 3 つのサブタイプが存在している。PPAR は LXR と同様に核内受容体スーパーファミリーに属していることから、フォールド構造も類似している。そこで、LXR リガンドをテンプレートとして PPAR リガンドを創製できると考えた。LXR、PPAR の内因性リガンドはそれぞれ oxysterol と脂肪酸であることから、PPP 骨格に PPAR の内因性リガンドの脂肪酸の部分構造を導入することで PPAR に対して選択的なリガンドが創出できると考え、種々誘導体を合成した。

活性評価の結果、9 に α/δ デュアルアゴニスト活性が認められた。続いて更なる活性向上を目指し、ドッキングシミュレーションを用いて Structure based drug design を行ったところ、化合物 10-12 に活性の向上が認められた。また絶対配置がそれぞれのサブタイプへの活性に及ぼす影響が異なることを見出し、サブタイプ選択性獲得における新たな手法となりうると考えている。



Compound	R	PPARα		PPARδ		PPARγ	
		Emax	EC ₅₀ [μM]	Emax	EC ₅₀ [μM]	Emax	EC ₅₀ [μM]
9	-	53%	11	27%	13	7%	N.D.
(S)-10	Me	66%	8.9	41%	7.3	102%	7.1
(R)-10	Me	103%	4.5	8%	-	40%	12
(S)-11	Et	79%	3.3	50%	3.4	62%	6.2
(R)-11	Et	120%	1.5	13%	9.3	23%	9.3
(S)-12	n-Pr	67%	1.8	62%	2.2	36%	7.9
(R)-12	n-Pr	65%	2.8	16%	9.3	7%	-

Figure 6. PPAR リガンド 9-12.

【第6章 GPR40 アゴニストの創製】

Gタンパク質と共役している G-protein coupled receptor (GPCR) は多くの研究者、企業が取り組んでいる標的分子ファミリーである。GPCR の中で糖尿病との関連が報告されているものに GPR40 がある。GPR40 はすい臓に高発現しており、長鎖脂肪酸を内因性リガンドとしている。GPR40 も PPAR と同様に長鎖脂肪酸を内因性リガンドとすることから、PPAR リガンドが GPR40 活性を示すのではないかと考え、これまでに合成した PPAR 活性を示す PPP 誘導体を活性評価した。

評価系の問題もあるが、活性評価の結果、PPAR に対して活性を示した化合物が GPR40 に対しても活性を示す可能性がある結果が得られた。

【第7章 制限酵素阻害剤の創製】

これまでマルチ創薬テンプレート手法を用いて核内受容体、酵素に対するリガンドを創製してきたが、これまでターゲットにしてこなかったものとして核酸認識酵素が挙げられる。そこで、マルチ創薬テンプレート手法の更なる拡張として、核酸認識酵素に対する阻害剤開発を行うことにした。標的タンパク質としては活性評価が容易であり、endonuclease の中で代表的な制限酵素を選択した。

PPP 誘導体からスクリーニング、構造展開を行ったところ、EcoRI に対して高活性を示す化合物 13、14 の創製に成功した。

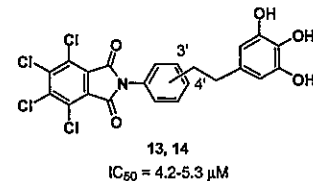


Figure 7. EcoRI 阻害剤 13,14.

【第8章 抗インフルエンザ剤の創製】

A 型インフルエンザのゲノムはセグメント化された single stranded RNA (-)から成り、転写、複製には RNA-dependent RNA polymerase 活性が必要である。A 型インフルエンザの RNA-dependent RNA polymerase は PA、PB1、PB2 の 3 つのサブユニットから成る。PA は endonuclease の active site を含み、PB2 は K627 を

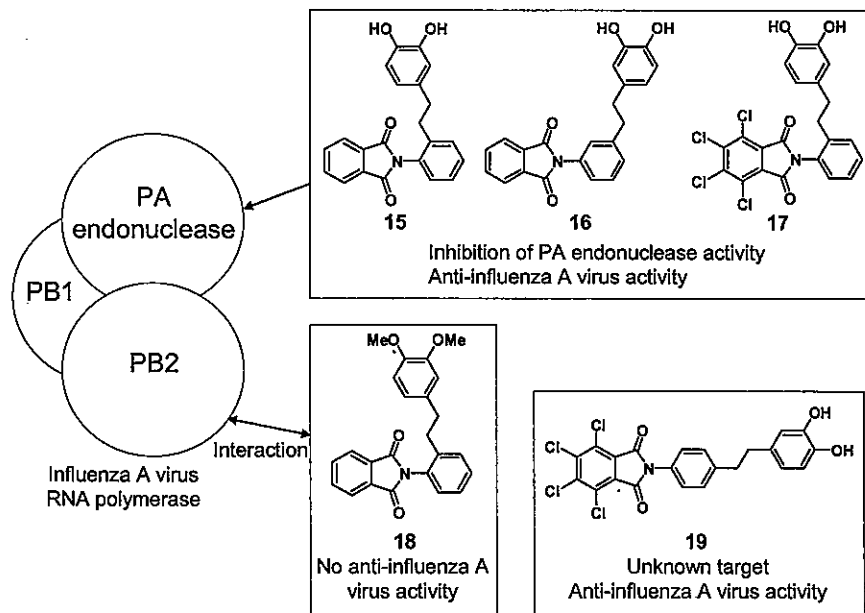


Figure 8. PPP 誘導体の A 型インフルエンザウイルス RNA polymerase に対する相互作用マップ

含み病原性に関わる。そこで、これまでに見出している PPP 誘導体について PA endonuclease 阻害活性評価、PB2 627 domain-binding assay、抗 A 型インフルエンザウイルス活性評価を行った。

活性評価の結果、化合物 15、16、17 において PA endonuclease とインフルエンザウイルスに対する活性が認められた。また、18 はいずれの活性も示さなかったが病原性に関わっていると考えられている PB2 subunit との相互作用が認められた。さらに 19 は PA endonuclease 阻害活性を示さないがインフルエンザウイルス増殖阻害活性を示し、抗ウイルス活性に関わる未知の標的が存在していると考えられる。Figure 8 に PPP 誘導体の A 型インフルエンザウイルス RNA polymerase に対する相互作用マップをまとめた。

【第 9 章 総括】

マルチ創薬テンプレート手法の有用性を示すべく、タンパク質のフォールド構造に着目し新規生理活性物質の創製と各種タンパク質に対する選択的リガンドの創製を行った。これらの結果より、生理活性物質の創製において本手法が非常に有用であることを示すことができた。