

論文の内容の要旨

論文題目

PFIC2 の原因となる変異型 BSEP の機能を修正する新規小分子の発見と構造展開

氏名 三澤 隆史

胆汁酸は、コレステロールの代謝により肝臓で生合成されるステロイド骨格を有する有機アニオンの総称である。肝細胞から胆汁中へ排出された胆汁酸は浸透圧差を形成し、胆汁流形成の主要な駆動力となる。また、肝細胞内の胆汁酸塩の蓄積はアポトーシス及びネクローシスを招くため、胆汁酸塩排出は肝細胞の生存ひいては肝臓の正常な機能にとって必要不可欠である。近年、哺乳類の肝臓における ATP 依存的胆汁酸塩トランスポーターとして ABCB11/BSEP(Bile Salt Export Pumps)が同定された。BSEP は肝細胞の毛細胆管側膜上に発現し、肝細胞からの胆汁酸 (特にコール酸やグリココール酸、タウロコール酸) 排出に重要な役割を担っている。

BSEP の変異による機能不全は致死性の難治疾患である PFIC2 (Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type2) を引き起こす¹。近年、林らは PFIC2 患者に多く認められる BSEP 変異体 (E297G, D483G) を用いて、その細胞内挙動を検討し、細胞膜上の BSEP 発現量が低下していること、2つの BSEP 変異体は正常な輸送機能を有していることが報告し、同じく林らは、低温培養、あるいは尿素サイクル異常症治療薬である 4-フェニル酪酸 (4-PBA) を処理することで BSEP 膜上発現量が増加し、トランスポーター機能を改善することを明らかにした²。4-PBA が示した BSEP 膜上発現量の増加・トランスポーター機能修正活性は PFIC2 に対し有用であり、マウスを用いた実験でも著効を示した²。しかしながら、4-PBA は活性発現に比較的高用量 (mM オーダー) を必要とすることが、PFIC2 治療薬を目指す上で問題となる。

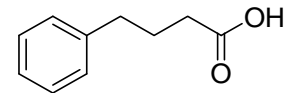


Figure 1. 4-PBA の構造

そこで私は、より低用量で活性を示す新規化合物の探索とその構造活性相関研究を目的として本研究に着手した。化合物探索の手がかりとしたのがファーマコロジカルシャペロンである。ファーマコロジカルシャペロンとは特定のタンパク質のフォールディング、成熟、トラフィッキングを低用量で促進する特異的な低分子化合物の総称である³。これまでのファーマコロジカルシャペロン研究から、変異型タンパク質に対する基質などのリガンドが、タンパク質の局在異常や機能不全を修正することが明らかにされている。そこで、私は BSEP の基質である胆汁酸に着目し、変異型 BSEP のトランスポーター機能修正活性を有する新規化合物の探索を行った。

【方法・結果】

イヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞である MDCKII 細胞を培養し、BSEP 遺伝子を組み込んだアデノウィルスを感染させることで、BSEP 発現細胞を構築した。その後、BSEP の基質として知られているタウロコール酸(Tc)の放射標識体 $[^3\text{H}]$ Tc で処理し、細胞内蓄積量を計測することで、BSEP 依存的な基質排出能を評価した。化合物の活性評価では、化合物処理 24 時間後に行い、細胞内 $[^3\text{H}]$ Tc 蓄積量(%)を指標とした(Figure 2)。

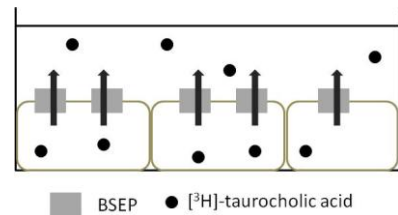


Figure 2. 活性評価方法

コール酸による変異型 BSEP のトランスポーター機能修正

まず、BSEP の基質として報告されているコール酸 (CA)の活性評価を行った。野生型 BSEP は正常に機能し、 $[^3\text{H}]$ -Tc の細胞内蓄積量が少ないのに対し、E297G 変異型では細胞内に $[^3\text{H}]$ -Tc が多く蓄積する。この変異体を CA で処理した結果、用量依存的に $[^3\text{H}]$ -Tc の蓄積量が減少しており、E297G 変異型 BSEP のトランスポーター活性を改善することが明らかとなった(Figure 3)。

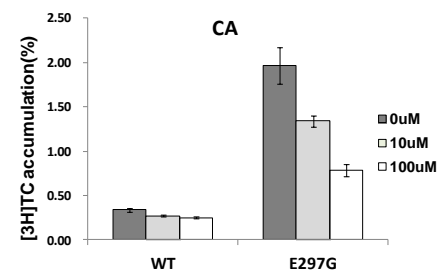
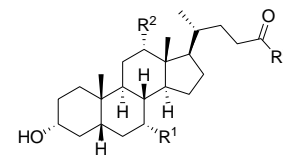


Figure 3. コール酸の活性評価

胆汁酸による変異型 BSEP のトランスポーター機能修正

次に、CA と同様に BSEP の基質として代表的なグリコール酸(Gc)やタウロコール酸(Tc)、また、その他の胆汁酸について活性評価を行った。その結果、Gc と Tc には活性が認められず、アミノ酸抱合はトランスポーター機能修正活性を大きく減弱させることが示唆された。一方、ヒドロキシ基の少ないデオキシコール酸(DCA)やケノデオキシコール酸(CDCA)、ウルソデオキシコール酸(UDCA)にも活性が認められた。特に、CDCA と UDCA には CA と同程度の活性が認められた。以上、各胆汁酸が変異型 BSEP のトランスポーター機能を改善することを明らかにした。

Table 1. 胆汁酸の構造と活性評価



Compd.	R ¹	R ²	R ³	Accumulation of $[^3\text{H}]$ -Tc(%) at 100 μM
Cholic acid (CA)	OH	OH	OH	40%
Glycocholic acid (Gc)	OH	OH	Glycine	108%
Taurocholic acid (Tc)	OH	OH	Taurine	105%
Deoxycholic acid (DCA)	H	OH	OH	65%
Chenodeoxycholic acid (CDCA)	β -OH	H	OH	46%
Ursodeoxycholic acid (UDCA)	α -OH	H	OH	43%

非ステロイド骨格を有する変異型トランスポーター機能修正小分子の発見

胆汁酸に変異型 BSEP のトランスポーター機能修正活性が認められた。しかし、胆汁酸はステロイド骨格を有し、様々なタンパク質への交叉性や構造展開の際、置換基の導入位置が限られるなどの問題がある。そこで、ステロイド骨格を持たない、新たな小分子化合物の探索を行った。

CDCA は核内受容体の Farnesoid X receptor (FXR) の生体内リガンドとして知られている。FXR は肝臓や小腸に主に発現し、胆汁酸の合成や排出、抱合、輸送等に関わる遺伝子を直接あるいは間接的に制御し、胆汁酸の恒常性を保っている。加えて、FXR はコレステ

ロール及び脂質代謝のみならず、糖代謝にも深く関与しており、動脈硬化やその他の代謝性疾患の治療薬ターゲットとして期待され、これまでに多くの合成リガンドが報告されている⁴。なかでも、転写活性化作用が強く代表的なリガンドとして GW4064 が知られている。FXR は CDCA と GW4064 を認識することから、GW4064 は CDCA 等価体として機能しており、CDCA と同様、変異型 BSEP のトランスポーター機能修正活性を示すのではないかと考えた。そこで、GW4064 の活性評価を行った。その結果、GW4064 は用量依存的に E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能を改善することを見出した(Figure 4)。

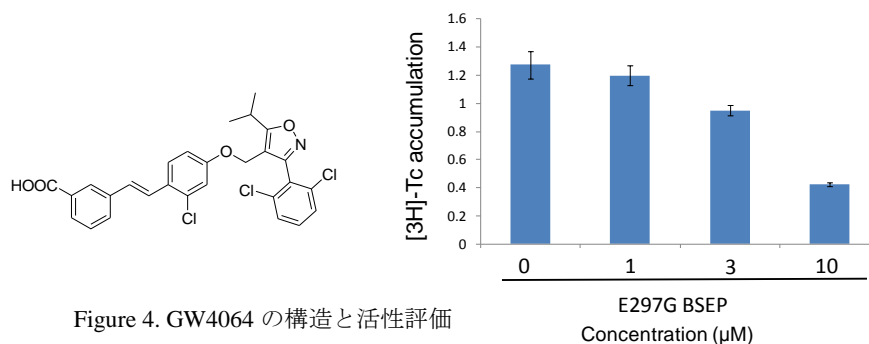


Figure 4. GW4064 の構造と活性評価

化合物デザイン

当研究室では GW4064 をリード化合物とした構造展開を行い、GW4064 の二重結合をアミド結合に変換した FXR リガンドを見出している。そこで、このアミド型化合物の合成・活性評価・構造展開を行うことで、構造活性相関の獲得を目指した。まず、二重結合をアミド結合へと変換した化合物ならびに、アミド結合窒素原子上にアルキル基を置換した化合物を合成し・活性評価を行った。

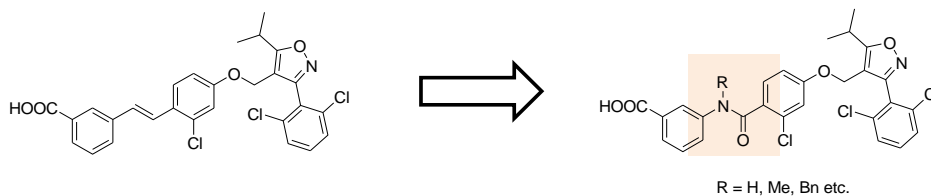


Figure 5. 化合物デザイン

構造展開

GW4064 の二重結合部位をアミド結合にすることで、活性が大きく消失することが明らかとなった。しかし、アミド結合の窒素原子上にアルキル基を導入することで、トランスポーター機能修正活性を示すことを見出した。さらに、アルキル鎖を長くすると活性が向上し、ベンジル基を導入した化合物に最も強い活性が認められた。一方、ベンジル基よりも嵩高い置換基を導入すると活性は減弱し、ベンジル基が最適な置換基であることを見出した(Table 2)。アミド結合窒素原子上へのアルキル基の導入は活性発現に重要であり、ベンジル基程度の大きさのポケットの存在が示唆された。

Table 2. アミド型誘導体と活性評価

Compd.	R	Accumulation of [³ H]-TC(%) at 10 uM
GW4064		33%
9g	H	111%
9a	Me	66%
9b	CH ₂ CH ₂ Me	49%
9c	CH ₂ CH ₂ Ph	31%
9d	CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	53%
9e	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	59%
9f	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	70%

次に、最も強いトランスポーター機能修正活性を示した **9c** の用量依存性の検討を行った。その結果、**9c** は用量依存的に E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能を修正することが明らかとなった。また、その活性は GW4064 と同程度であった。

新しく **9c** をリード化合物として構造展開を行い、カルボン酸の活性への影響や置換基効果といった構造活性相関を得た。

9c の経細胞輸送実験

これまでの展開で得られた化合物である **9c** の有用性をさらに検討するために、経細胞輸送実験を行った。トランスウェル上で MDCKII 細胞を培養し、変異型 BSEP を導入すると生理的局在と一致した apical 膜上に局在する。したがって、basal 側から apical 側への経細胞輸送速度と細胞内濃度を測定し、apical 膜を介した [³H]Tc 輸送パラメータ PS_{apical} を算出することで、より生理的条件に近い系での BSEP 依存的な輸送活性を評価した。活性評価の結果、**9c** は 10 μM で経細胞輸送量を上昇させることが明らかとなった (Figure 6)。

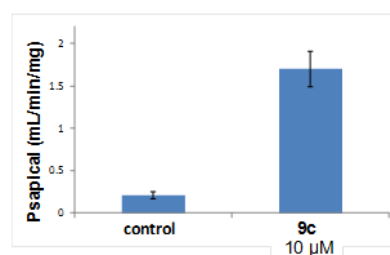


Figure 6. GW Bn の経細胞輸送実験

作用メカニズム解析

E297G 変異型 BSEP の構造展開の過程で得られた化合物群の作用メカニズム解析を行った。その結果、CA や **9c** は E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能を修正することが明らかとなり、**9c** は現在報告されている化合物の中で、最も低用量でトランスポーター機能を修正することが明らかとなった。

次に、E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能修正活性が、作業仮説通りファーマコロジカルシャペロンとして機能しているかを検討した。ファーマコロジカルシャペロンとして作用すれば、タンパク質の成熟を促し、膜上発現量の増加が認められるはずである。しかし、各種実験の結果、本研究で見出した化合物は E297G 変異型 BSEP の成熟過程・膜上発現量いずれにも影響を与えないような結果が得られた。また、膜上発現量の増加が認められなかったため、4-PBA とは異なる作用メカニズムで E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能を修正している可能性が示唆された。

【まとめと考察】

BSEP の基質である胆汁酸に着目し、E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能を修正する新規小分子化合物の探索を行った。その結果、基質である CA や CDCA は 100 μM 処理でトランスポーター機能修正活性を示すことを見出した。また、非ステロイド骨格を有する GW4064 及びその誘導体も同様にトランスポーター機能修正活性を示すことを見出した。本研究により、10 μM 処理で E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能を修正する **9c** の創製に成功した。今後、化合物の作用メカニズム解析や in vivo での有効性を評価することで、PFIC2 治療薬への新たな創薬ターゲットを提示できるものと考えている。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、多大なご支援ならびにご指導ご鞭撻を賜りました
薬学系研究科分子薬物動態学研究室 杉山雄一教授、林久允助教に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- (1) N, Arnell H, et al. *Nat. Genet.* 1998, 20, 233.
- (2) H. Hayashi and Y Sugiyama. *Hepathology*, 2007, 45, 1506.
- (3) T. W. Loo and D. M. Clarke. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2007, 28, 1.
- (4) M. Kainuma, M. Makishima, Y. Hashimoto, and H. Miyachi. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 2587.