

[別紙2]

審査の結果の要旨

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。林ら (東大・薬) 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を報告し、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活性を改善することを明らかにした。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 に対し有用であると考えられているが、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。

三澤隆史の研究は、4-PBA の問題点を改善すべく、ファーマコロジカルシャペロンを参考にし、より低用量で E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能を修正する新規化合物の探索とその構造活性相関研究をおこなったものである。

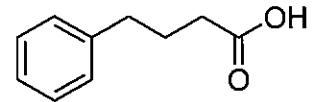
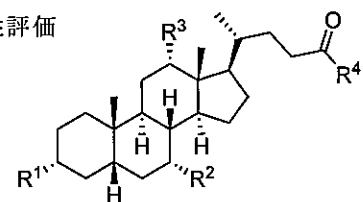


Figure 1. 4-PBA の構造

胆汁酸による変異型 BSEP のトランスポーター機能修正

BSEP の基質として代表的なコール酸 (CA)、グリココール酸 (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。三澤は、ファーマコロジカルシャペロンを利用し、各胆汁酸が E297G 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	R ⁴	Accumulation of [³ H]-TC(%) at 100 μM
Cholic acid (CA)	OH	OH	OH	OH	40%
Glycocholic acid (GC)	OH	OH	OH	Glycine	108%
Taurocholic acid (TC)	OH	OH	OH	Taurine	105%
Deoxycholic acid (DCA)	OH	H	OH	OH	65%
Chenodeoxycholic acid (CDCA)	OH	β-OH	H	OH	46%
Ursodeoxycholic acid (UDCA)	OH	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、三澤は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。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。三澤は、GW4064 が 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 2)。

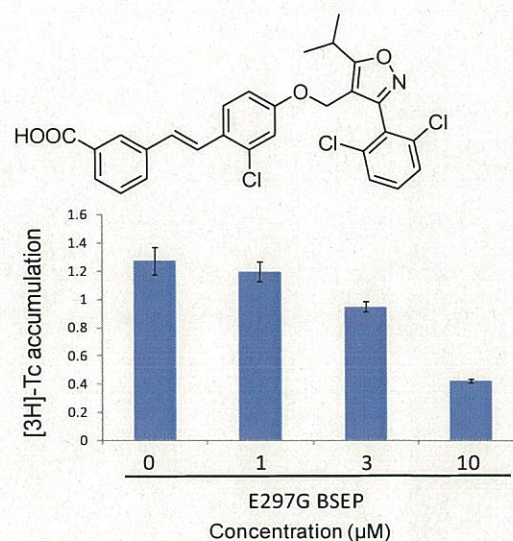


Figure 2. GW4064 の構造と活性評価

化合物デザイン

貝沼ら (東大・分生研) 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 3)

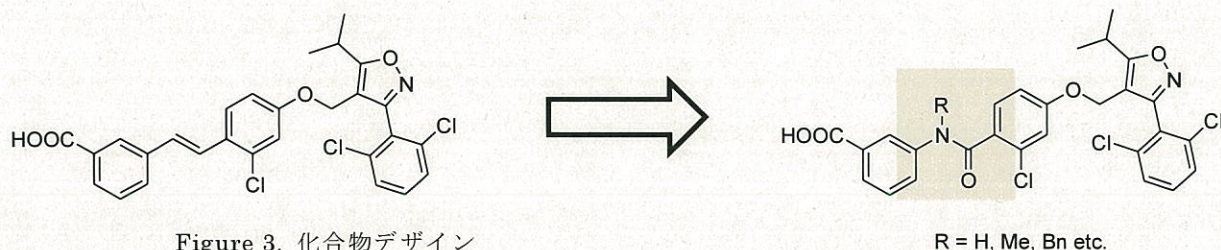


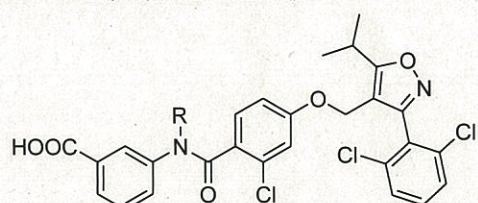
Figure 3. 化合物デザイン

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 (1)。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 (2, 3)。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 (4)。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 (5, 6)、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。

次に、最も強いトランスポーター機能修正活性を示した 4 の用量依存性の検討を行った。その結果、4 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。4 は GW4064 よりも強い活性を示し、現在報告されている化合物の中で最も強い活性を示した。

Table 2. アミド型誘導体と活性評価



Compd.	R	Accumulation of [3H]-TC (%) at 10 μM
GW4064		33%
1	H	111%
2	Me	66%
3	Me (long chain)	49%
4	Bn	31%
5	Phenyl	59%
6	Naphthyl	70%

以上、三澤隆史は 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 μ M 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 μ M 処理で E297G 変異型 BSEP のトランスポーター機能を修正する化合物 **4** 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。本研究結果は、未だ有効な薬物治療が確立されていない PFIC2 に対する医薬化学研究に大きく貢献するものであり、博士（薬学）の授与に値するものと認められる。