

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

新規リードスルー惹起物質による
ナンセンス変異型筋疾患治療のための前臨床試験

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 良一

平成20(2008)年 4月

様式A-1 (5)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成20年4月1日

国立精神・神経センター総長 殿

住所 〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

マツダ リョウイチ

研究者 氏名 松田 良一



(所属機関 東京大学大学院 総合文化研究科)

平成19年度厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）に係わる研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：新規リードスルー惹起物質によるナンセンス変異型
筋疾患治療のための前臨床試験（H19-こころ-020）

国庫補助金精算所要額：金 25,000,000円也（うち間接経費 0円）

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書
5. 研究成果の刊行に関する一覧表
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

はじめに

リードスルー薬物による治療法は、遺伝子が維持されたまま翻訳機構に干渉し、正常機能タンパク質の発現を回復させる試みとして国際的に注目されており、ナンセンス変異型筋ジストロフィーにおける筋細胞膜でのジストロフィンの役割を回復するための有効かつ迅速な選択肢となると考えられている。たとえ少量のジストロフィンでも筋ジストロフィーの進行を遅延させ、患者様のQOLの向上と延命を図ることができるため、人類福祉への直接的還元として大きく寄与するものと考えられる。

我々は、未承認抗生物質ネガマイシンがマウス骨格筋に対してリードスルー活性を持つことを示してきた。本研究「新規リードスルー惹起物質による筋疾患治療のための前臨床試験」において、平成19年度には以下の研究成果を得たので報告する。

1) 個体レベルでのリードスルー活性検出系となるトランスジェニックマウスをTGA,TAA,TAGの3種のナンセンスコドン毎に3系統確立し、その全身凍結切片から発現部位を特定した。

2) 上記トランスジェニックマウスを用いて、ネガマイシンと三次元類似構造をもつ化合物群から5種、擬二糖類・4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基で修飾されたアミノグリコシド類・カナマイシン類の抗菌性物質から3種の新規リードスルー惹起化合物を特定した。その中の1つ（化合物#2）は、リードスルー効率が高く経口投与においてもその活性を維持することを確認した。

3) 化合物#2について2週間連日投与による亜急性毒性試験では聴力・体重・血清生化学においても異常は認められず、安全性の高い物質であることを確認した。またmdxマウスに強制胃内投与した結果、血清クレアチンキナーゼ活性の低下と免疫染色によるジストロフィタンパク質の蓄積を確認し、DMD患者様由来培養筋細胞においてもジストロフィン陽性を示した。

本研究実施にあたり、平成19年度厚生労働省科学研究費「こころの健康科学研究事業」のご援助をいただいたことに深く感謝いたします。

平成20年4月1日 主任研究者 松田良一（東京大学大学院総合文化研究科）
交付額平成19年度 25,000千円（直接研究費のみ）

目次

I. 総括研究報告

新規リードスルー惹起物質による

ナンセンス変異型筋疾患治療のための前臨床試験

松田良一1

II. 分担研究報告

アミノグリコシド抗生物質のリードスルー活性に関する研究

池田大四郎8

ネガマイシンの化学構造に立脚したin silicoスクリーニングによる

ナンセンス変異型筋ジストロフィー治療薬の探索に関する研究

高橋良和12

患者様由来培養細胞を用いた解析

松尾雅文15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表19

研究成果による特許権等の知的財産権の出願状況20

IV. 研究成果の刊行物・別刷21

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

新規リードスルー惹起物質によるナンセンス変異型筋疾患治療法のための前臨床試験

主任研究者 松田良一 東京大学大学院総合文化研究科 准教授

研究要旨

アミノグリコシド系抗菌性物質やサイクロヘキシミドはリボソームに結合し、点変異により生じた未熟終止コドン（PTC）とrRNAのA部位との結合を阻害することでPTCを読み越えて翻訳を進行【リードスルー】させ、全長タンパク質分子を作らせることが知られている。この性質を応用したリードスルー薬物療法は、多くの致死性疾患を含むナンセンス変異症例の包括的薬療法としても有望であることから、遺伝子導入や幹細胞移植に次ぐ第3の革新的な有効かつ迅速な治療法として期待されている。本研究課題の目的は、ナンセンス変異型筋疾患治療のために、PTCを克服するリードスルー惹起作用をもつ新薬を提案し、リードスルー薬物による治療戦略を確立することにある。

本研究課題に関し、個体レベルでのリードスルー活性検出系となるトランスジェニック（Tg）マウスの確立、それらを用いたリードスルー惹起化合物の探索とその投与方法の検討、モデル動物や患者様由来培養細胞での薬効の検証を行った。当該事業年度において、未承認アミノグリコシド系抗菌性物質3種と新規リードスルー惹起薬物候補を5種特定し、うち1種については経口投与が可能であること、亜急性毒性が見られないこと、デュシャンヌ型筋ジストロフィーの疾患モデル動物であるmdxマウスやDMD患者様由来培養筋細胞においてジストロフィンの回復が見られることを確認した。

分担研究者

副センター長)

池田大四郎（財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究センター

松尾雅文（神戸大学医学部小児科 教授）

副センター長)

A. 研究目的

高橋良和（財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究センター

アミノグリコシド系抗菌性物質やサイクロヘキシミドはリボソームに結合し、点変

異により生じた未熟終止コドン (PTC) と rRNAのA部位との結合を阻害することで PTCを読み越えて翻訳を進行【リードスルー】させ、全長タンパク質分子を作らせることが知られている。本研究は、独自のリードスルー活性解析系として、3種 (TAA, TAG, TGA) のPTCをそれぞれ挿入した β -ガラクトシダーゼとルシフェラーゼのデュアルレポーター遺伝子を組み込んだ3種のトランスジェニック (Tg) マウス系統を作成し、これらのTgマウスを用いてリードスルー惹起薬物候補の投与経路や投与量の最適化を行い、リードスルー物質のナンセンス変異型筋ジストロフィーに対する治療効果を検証することを目的としている。

B. 研究方法

Tgマウスの確立

生体内でのリードスルー活性解析において、薬効評価を定量化かつ効率化する目的で、 β -ガラクトシダーゼとルシフェラーゼ遺伝子を連結し、その繋ぎ目に3種類のPTCを挿入した3種類のコンストラクト (mdxマウスのエクソン23のPTC前後12mer周辺配列を含む27mer) を含む、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーターを有する発現ベクター (pCAGGS) を生殖

細胞系列に組み込んだTgマウス系統を作出した。PTC部位にはOchre, Amber, Opal (TAA, TAG, TGA) をそれぞれ挿入した。作出されたTgマウス全身切片のX-gal染色を行い、発現部位を特定した。

リードスルー惹起物質の探索

in silico三次元データ解析により105万種以上の化合物から選定されたネガマイシンの立体配位形成に適合する類似物質から選定した化合物群、カナマイシン類、ゲンタマイシン類縁体およびこれらに属さない擬二糖アミノグリコシド抗生物質群をTgマウスに一週間連日皮下投与した。大腿部骨格筋組織抽出液のルシフェラーゼ活性と β -ガラクトシダーゼ活性をルミノメータで定量し、リードスルー活性をルシフェラーゼ活性/ β -ガラクトシダーゼ活性として算出した。また新たなリードスルー惹起物質候補を得るため、ネガマイシン分子中に含まれる多くのヘテロ原子およびそのヘテロ原子に結合した活性水素による電子授受に着目したin silico探索を試みた。

モデル動物や患者様由来培養細胞を用いた リードスルー惹起物質の効果検討

特定したリードスルー惹起薬物候補に関し、その投与方法や亜急性毒性をデュシェ

ンヌ型筋ジストロフィーの疾患モデル動物であるmdxマウスを用いて検討した。また、ジストロフィン遺伝子にTGAのナンセンス変異を有するDMD患者様から、インフォームドコンセントを得て筋生検により筋細胞株を樹立した。この培養細胞を用いて生化学的・免疫組織化学的に薬効を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究課題の解決に当たっては、動物実験が必要不可欠かつ唯一の手段であったため動物愛護の観点に配慮しつつ、科学的観点に基づく適正な動物実験を実施した。

「動物の愛護及び管理に関する法律（改正動物愛護管理法，平成18年6月施行）」と「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（飼養保管基準，平成18年4月環境省告示第88号）」の規定を踏まえ策定された「東京大学動物実験マニュアル」に準拠し、東京大学大学院に設置された動物実験委員会と組み替えDNA実験委員会の指針に従い、承認を得て行われたものである。具体的に目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度及び再現性を左右する実験動物の数、遺伝学的及び微生物学的品質並びに飼養条件を考慮した上で動物実験計画を立案し、麻酔使用による苦痛の除去・軽減、実験個体数の削減等を徹

底し適切に利用することに配慮した。そのため、実験実施者の教育訓練等を通じて、安全確保及び健康保持、自主管理とその情報公開を行い、施設及び設備における実験動物の飼養・保管・輸送についても必要な方法で適切に維持管理し、適正な動物実験が実施されることに相当の注意を払い監督した。倫理的・法的・社会的問題に関わる全ての指針を遵守することで、研究が適正に推進されるよう十分に配慮した。

C. 研究結果

Tgマウスの確立

本研究で作出したデュアルレポーターTgマウスは、正常時は β -ガラクトシダーゼのみが発現しPTCをリードスルーすることでルシフェラーゼを発現するため摘出した組織抽出液から β ガラクトシダーゼ活性とルシフェラーゼ活性をルシフェリン-ガラクトシダーゼとルシフェリンを用いてルミノメータにより測定することで生体内の定量的かつ効率的な薬効評価が可能である。このTgマウス全身切片のX-gal染色から、横隔膜を含む骨格筋や心筋での強い発現を確認した。

リードスルー惹起物質の探索

ネガマイシンの立体配位形成に適合する化合物群から、現在までに5種の新規リー

ドスルー惹起化合物を特定した。特定したリードスルー惹起薬物候補の中の一つ（化合物#2）は、これまでにリードスルーを惹起することが知られているゲンタマイシンやネガマイシンよりもその効率が高く、濃度依存的な活性をもち、低分子（分子量174）で経口投与による有効性も確認された。またアミノグリコシド系抗生物質群についても、1) 擬二糖類の一部がゲンタマイシンと比較して良好なリードスルー活性を示すこと、2) アミカシン、アルベカシンにある4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基で修飾されたアミノグリコシド類の中にもゲンタマイシンと同等のリードスルー活性を示す物質が存在すること、3) カナマイシン群にもリードスルー活性が見られること、4) 抗菌活性、毒性とリードスルー活性とは必ずしも相関しないこと、等が明らかになった。さらに、ネガマイシン分子中のヘテロ原子およびそのヘテロ原子に結合した活性水素に着目し、これら原子と標的となる分子間に電子の授受があると仮定したスクリーニングにより、約300種の化合物を選定した。

モデル動物や患者様由来培養細胞を用いた リードスルー惹起物質の効果検討

化合物#2を経口胃ゾンデを用いmdxマウスに一週間連日強制胃内投与した結果、血

清クレアチンキナーゼ活性の低下と免疫染色によるジストロフィンタンパク質の蓄積を確認した。また正常マウスを用いた2週間連日投与の亜急性毒性では、投与期間中（4~400mg/kg、2週間連日皮下投与）の体重変化や、聴性脳幹反応による聴力検査、18項目（総タンパク質、アルブミン、アスパラギン酸トランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ、クレアチニン、グルコース、トリグリセライド、リン脂質、総コレステロール、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン、総ビリルビン、アルブミン/グルコース比）における血清生化学検査においても異常は認められなかった。また、化合物#2で処理したDMD患者様由来培養細胞はジストロフィン陽性を示した。

D. 考察

生体内でのリードスルー活性の薬効評価を効率化する解析系として、PTC（TAA, TAG, TGA）をそれぞれ挿入した3種のデュアルレポーターTgマウスを保有しており、これらを用いて、三次元データ解析により105万種以上から特定したネガマイシンの立体配位形成に適合する化合物から、現在までに5種の新規リードスルー惹起化

化合物を特定した。これら5種の新規リードスルー惹起物質とリードスルー解析系となるTgマウスについてはPCTに基づく国際特許出願中である（PCT/JP2007/063436）。これらは今後の創薬研究に貢献し、その技術開発に提供しうる強力な知的財産となる。化合物#2は、ゲンタマイシンやネガマイシンよりもリードスルー効率が高く濃度依存的な活性をもち経口投与可能である。またmdxマウスを用いた解析においても免疫染色によるジストロフィンタンパク質の蓄積やクレアチンキナーゼ活性の低下を認めている。安全性においても、投与期間中（0.1~10mg/匹、2週間連続投与）の体重変化や聴性脳幹反応による聴力検査、18項目における血清生化学検査においても異常は認められず、患者様由来培養細胞を用いた効果検定においてもわずかながらジストロフィン発現の促進作用を示した。リードスルー効率と安全性が高く、経口投与可能である化合物#2は薬物候補として有望である。これらに加え擬二糖類、4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基で修飾されたアミノグリコシド類、カナマイシン類のさらに詳細な構造活性相関およびこれまでに蓄積された毒性結果を加味することにより新規薬剤創製の可能性が明らかとなった。また、これまでの*in silico*探索に比べ、1) 不斉点を持つ化合物

が数多くヒットした 2) ネガマイシンのヒドラジン部位に相当する箇所には多種の含窒素複素環が導入された 3) ネガマイシンの末端の一級アミノ基に相当する箇所には四級アミノ基、モルフォリノ基を含む三級アミノ基が導入された 構造をもつ化合物群を約300種選定することができた。

E. 結論

リードスルー活性検出系となるTgマウスの確立、それらを用いたリードスルー惹起化合物の探索とその投与方法の検討、モデル動物での薬効検証を行った結果、新規リードスルー惹起薬物候補を5種特定し、そのうちの1種については経口投与が可能であること、亜急性毒性が見られないこと、mdxマウスにおいてジストロフィンの回復が見られること、DMD患者様由来培養細胞におけるリードスルー誘導効果等を確認した。また、擬二糖類、4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基で修飾されたアミノグリコシド類、カナマイシン類からも新規リードスルー惹起物質を特定することができた。今後、化合物#2の安全性試験を含む有効性についての検討を進めながらリードスルー惹起薬物候補物質を可能な限り増やし新規リードスルー惹起物質の前臨床のProof-of-Conceptを確立するつもりである。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Shiozuka M, Hatin I, Paturneau-Jouas M, Gartioux C, Butler-Browne GS, Mouly V, Rousset JP, Matsuda R, and Guicheney P Antibiotic-mediated readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin 2 chain mRNA in congenital muscular dystrophy myotubes.

Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S, Sydnés MO, Hashimoto D, Hasegawa J, Katoh T, Kajimoto T, Shiozuka M, Matsuda R, Noda M, and Kiso Y. Efficient total synthesis of (+)-Negamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases. Chem. Comm. in press

塩塚政孝, 松田良一 ナンセンスコドンを読み飛ばせ 遺伝 61: 10-12 (2007)

2. 学会発表

Shiozuka M, Arakawa M, Takahashi Y, Ikeda D, Nonomura Y, and

Matsuda R. Pharmacological suppression of nonsense mutations by orally administered novel drug candidates. FASEB Summer Research Conference 5th “Muscle satellite and stem cells”

Shima A and Matsuda R. Expression of Myogenin, but Not of MyoD, Is Temperature-sensitive in Mouse Skeletal Muscles. The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting (2007)

Kikkawa N, Shiozuka M, and Matsuda R. Ectopic calcification in mdx mouse skeletal muscle IV. The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting (2007)

塩塚政孝, 荒川正行, 高橋良和, 池田大四郎, 野々村禎昭, 松田良一 ナンセンスコドンの無効化を誘発する分子による mdxマウスのジストロフィン発現回復 日本動物学会第78回大会(2007)

島亜衣, 松田良一 筋分化制御因子 myogeninの温度依存的発現 日本動物学会第78回大会(2007)

吉川奈美子, 松田良一 mdxマウス骨格筋の異所的石灰化4 日本動物学会第78回大会(2007)

長田洋輔, 松田良一 スフィンゴ脂質によつて媒介される筋衛星細胞活性化の制御機構 日本動物学会第78回大会(2007)

林良雄, 西口茂信, 橋本大佑, Magne O Sidnes, Thomas Regner, 長谷川純也, 加藤哲也, 塩塚政孝, 松田良一, 野出学, 木曾良明 Duchenne型ジストロフィー治療薬を目指したネガマイシンおよびその誘導体の合成研究 第44回ペプチド討論会(2007)

島亜衣, 松田良一 筋分化制御因子 myogeninの温度依存的発現 日本動物学会関東支部大会(2008)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

PCT出願 (PCT/JP2007/063436)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

アミノグリコシド抗生物質のリードスルー活性に関する研究

分担研究者 池田大四郎 財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究センター 副センター長

研究要旨

ゲンタマイシンにおいて既に見出されているリードスルー活性を指標にして、カナマイシン類、ゲンタマイシン類縁体およびこれらに属さない擬二糖アミノグリコシド抗生物質についてリードスルー活性を測定し構造活性相関を検討した。

A. 研究目的

アミノグリコシド抗生物質はバクテリアのrRNAに作用し、そのたんぱく質合成を阻害することにより抗菌剤として広く臨床の場で使用されている。一方、アミノグリコシド抗生物質が真核細胞においてリードスルー活性を示すことが近年報告されナンセンス変異型筋ジストロフィーの治療に使用されている。

デュアルレポーター遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて当研究センター保有の各種アミノグリコシド抗生物質のリードスルー活性を測定し構造活性相関を検討し治療に使用されているゲンタマイシンを凌駕する薬剤を創製する。

B. 研究方法

当研究センターは微生物代謝産物であるカナマイシンから有機合成の手法によりジ

ベカシン、アルベカシンへと展開し臨床の場に送り出した経緯から多くの類縁体を保有している。また、多くの擬二糖を含むアミノグリコシド抗生物質を微生物代謝産物より見出した。これらの化合物を有効に活用し、リードスルー活性を測定し詳細な構造活性相関を検討した。

C. 研究結果

β -ガラクトシダーゼとルシフェラーゼを未熟終止コドンで連結させた遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いたリードスルー活性測定法において、より詳細な構造活性相関を明らかにするために、未熟終止コドンとしてTAAおよびTGAを持った2種のトランスジェニックマウスを用いて同時に試験することにより評価した。その結果、アミノグリコシド抗生物質について、

- a) 擬二糖類の一部がゲンタマイシンと比較して良好なリードスルー活性を示すこと
- b) アミカシン、アルベカシンにある4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基で修飾されたアミノグリコシド類の中にもゲンタマイシンと同等のリードスルー活性を示す物質が存在すること
- c) カナマイシン群にもリードスルー活性が見られること
- d) 抗菌活性、毒性とリードスルー活性とは必ずしも相関しないこと
等が明らかになった。

D. 考察

未熟終止コドンとしてTAAおよびTGAを持った2種のトランスジェニックマウスを用いて同時にリードスルー活性を測定することにより、より正確な活性評価ができた。その結果、より妥当な構造活性相関を導くことができた。擬二糖類、多数保有する4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基で修飾されたアミノグリコシド類、カナマイシン類のさらに詳細な構造活性相関およびこれまでに蓄積された毒性結果を加味することにより新規薬剤創製の可能性が明らかとなった。

E. 結論

擬二糖類、多数保有する4-アミノ-2-ヒドロキシブチリル基で修飾されたアミノグリコシド類、カナマイシン類のリードスルー活性からゲンタマイシンを凌駕する新規薬剤創製の可能性を示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Valerie Allamand, Laure Bidou, Masayuki Arakawa, Celia Floquet, Masataka Shiozuka, Marion Patureneau-Jouas, Corine Gartoux, Gillian S. Butler-Browne, Vincent Mouly, Jean-Pierre Rousset, Ryoichi Matsuda, Daishiro Ikeda, Pascale Guicheney. Drug-induced readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin alpha2 chain mRNA in CMD myotubes. *J. Gene Med.*, 2008, 10, 217-224.

Yukiko Hiraiwa, Nobuto Minowa, Takayuki Usui, Yoshihisa Akiyama, Kazunori Maebashi, and Daishiro Ikeda. Effect of varying the 4"-position of arbekacin derivatives on antibacterial activity against MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg.*

Med. Chem. Lett., 2007, 17, 6369-6372.

Yukiko Hiraiwa, Takayuki Usui, Yoshihisa Akiyama, Kazunori Maebashi, Nobuto Minowa, and Daishiro Ikeda. Synthesis and antibacterial activity of 5-deoxy-5-episubstituted arbekacin derivatives. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, 17, 3540-3543.

Nobuto Minowa, Yukiko Hiraiwa, Yoshihisa Akiyama, Kazunori Maebashi, Takayuki Usui, and Daishiro Ikeda. Design and synthesis of novel ring-expanded arbekacin analogues. Heterocycles, 2007, 71, 1715-1721.

Isao Momose, Masatomi Iijima, Manabu Kawada, and Daishiro Ikeda. A new proteasome inhibitor, TP-110, induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, 71, 1036-1043.

Manabu Kawada, Hiroyuki Inoue, Masayuki Arakawa, Kozo Takamoto, Tohru Masuda, and Daishiro Ikeda. Highly

tumorigenic human androgen receptor-positive prostate cancer cells overexpress angiogenin. Cancer Sci., 2007, 98, 350-356.

Yohko Yamazaki, Setsuko Kunimoto, and Daishiro Ikeda. Rakicidin A: A hypoxia-selective cytotoxin. Biol. Pharm. Bull., 2007, 30, 261-265.

2. 学会発表

川田 学、荒川正行、井上裕幸、百瀬功、池田大四郎 Transforming growth factor-beta1 modulates tumor-stromal cell interactions of prostate cancer through insulin-like growth factor-I. 19th AACR-NCI-EORTC International Conference "Molecular Targets and Cancer Therapeutics"(2007)

百瀬 功、飯島正富、川田 学、池田大四郎 Characterization of proteasome inhibitor-resistant human prostate cancer PC-3 cells. 19th AACR-NCI-EORTC International Conference "Molecular Targets and Cancer Therapeutics"(2007)

飯島正富、百瀬 功、池田大四郎 TP-110, a new proteasome

inhibitor, down-regulates IAP and sensitizes death receptor-mediated apoptosis. 第66回日本癌学会学術総会(2007)

川田 学、荒川正行、増田 徹、池田大四郎 Suppression of prostate cancer by leucinostatins through the tumor-stromal cell interactions. 第66回日本癌学会学術総会(2007)

川田 学、井上裕幸、池田大四郎 TGF-betaによる前立腺癌-間質相互作用の変化 第16回日本がん転移学会総会(2007)

山崎洋子、川田 学、百瀬 功、池田大四郎 Rakicidinによる低酸素細胞選択毒性 第11回がん分子標的治療研究会総会(2007)

川田 学、井上裕幸、荒川正行、増田 徹、池田大四郎 TGF-betaによる前立腺間質IGF axisの調節 第11回がん分子標的治療研究会総会(2007)

百瀬 功、飯島正富、池田大四郎 プロテアソーム阻害剤耐性前立腺癌細胞株の樹立と耐性機序の解析 第11回がん分子標的治療研究会総会(2007)

Takumi Watanabe, Isao Momose, Masatoshi Abe, Hikaru Abe, Masatomi Iijima, Ryuichi Sawa, Yoji Umezawa, Daishiro Ikeda,

Yoshikazu Takahashi, Yuzuru Akamatsu Syntheses of boronic acid derivatives of tyropeptin, a proteasome inhibitor. ACS 40th National Organic Chemistry Symposium(2007)

渡辺 匠、百瀬 功、飯島正富、阿部光、阿部雅年、澤 竜一、池田大四郎、高橋良和、赤松 穰 プロテアソーム阻害剤チロペプチンのボロン酸誘導体の合成と生物活性 日本薬学会第127年会(2007)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

ネガマイシンの化学構造に立脚したin silicoスクリーニングによる
ナンセンス変異型筋ジストロフィー治療薬の探索に関する研究

分担研究者 高橋良和 財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究センター 副センター長

研究要旨

ネガマイシン分子中に含まれる多くのヘテロ原子およびそのヘテロ原子に結合した活性水素による電子授受に着目したin silicoスクリーニングを試み、候補化合物を選定した。

A. 研究目的

ネガマイシンがアミノグリコシド抗生物質と同様にリードスルー活性を示すこと、その立体構造に立脚したin silicoスクリーニングにより5種のリードスルー活性惹起化合物が見出されたこと等が当該主任研究者らにより明らかになった。ネガマイシンがアミノグリコシド抗生物質に比し低分子であること、低分子ではあるが分子中に多くのヘテロ原子を含むことに着目するとin silicoスクリーニングを検討する母核として優れている。また、すでに臨床の場で使用されているゲンタマイシン等のアミノグリコシド抗生物質とは構造を全く異としていることから新たな薬剤の創製が可能であると考え本研究に着手した。

B. 研究方法

これまでのネガマイシンの立体構造に立脚したin silicoスクリーニングとは異なる新たなin silicoスクリーニングを試みた。すなわち、ネガマイシン分子中のヘテロ原子およびそのヘテロ原子に結合した活性水素に着目し、これら原子と標的となる分子間に電子の授受があると仮定したスクリーニングである。当センターのライブラリーを含む市販の購入可能な化合物群をスクリーニングの対象とした。

C. 研究結果

当ヴァーチャルスクリーニングの結果、これまでに約300種の化合物を選定した。

D. 考察

ヒット化合物は当該主任研究者らが以前行ったin silicoスクリーニングにより得ら

れた化合物群と比べ以下の点で異なっていた。

1) 不斉点を持つ化合物が数多くヒットした。

2) ネガマイシンのヒドラジン部位に相当する箇所には多種の含窒素複素環が導入された。

3) ネガマイシンの末端の一級アミノ基に相当する箇所には四級アミノ基、モルフォリノ基を含む三級アミノ基が導入された。

ヒット化合物に関し、構造の多様性およびヒットスコアの高さを考慮してリードスルー活性、抗菌活性、毒性を評価している。

E. 結論

今回のヒット化合物は以前のヒット化合物とは構造上大きな差が見られる。したがって、アミノグリコシド抗生物質、前回のin silicoスクリーニングにより得られた化合物群とは異なるナンセンス変異型筋ジストロフィー治療薬の候補を提供できると考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomoya Yoshinari, Tetsuo Akiyama, Keita Nakamura, Tatsuhiko Kondo, Yoshikazu Takahashi,

Yasuhiko Muraoka, Yoshiaki Nonomura, Hiromichi Nagasawa, Shohei Sakuda. Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology*, 2007, 153, 2774-2780.

Yushi Futamura, Ryuichi Sawa, Yoji Umezawa, Masayuki Igarshi, Hikaru Nakamura, Kimiko Hasegawa, Mikio Yamasaki, Etsu Tashiro, Yoshikazu Takahashi, Yuzuru Akamatsu, Masaya Imoto. Discovery of incednine as a potent modulator of the anti-apoptotic function of Bcl-xL from microbial origin. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 1822-1823.

2. 学会発表

伊藤哲朗、Ali Zulfiqra、大山雅義、田中稔幸、飯沼宗和、大口健司、赤尾幸博、野澤義則、高橋良和、澤竜一、邑田仁、Darnaedi Dedye. フタバガキ科植物のスチルベンオリゴマーの構造と生物活性 第49回天然有機化合物討論会(2007)

澤竜一、久保田由美子、梅沢洋二、梅北まや、五十嵐雅之、高橋良和、赤松穰、

鶴沢洵、関宏子 DPGSE法を用いた
Macarbomycinの立体構造の解析 第
46回NMR討論会(2007)

渡辺 匠、百瀬 功、飯島正富、阿部
光、阿部雅年、澤 竜一、池田大四
郎、高橋良和、赤松 穰 プロテアソー
ム阻害剤チロペプチンのボロン酸誘導
体の合成と生物活性 日本薬学会第127
年会(2007)

Takumi Watanabe, Isao Momose,
Masatoshi Abe, Hikaru Abe,
Masatomi Iijima, Ryuichi Sawa,
Yoji Umezawa, Daishiro Ikeda,
Yoshikazu Takahashi, Yuzuru
Akamatsu Syntheses of boronic
acid derivatives of tyropeptin, a
proteasome inhibitor. ACS 40th
National Organic Chemistry
Symposium(2007)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

患者様由来培養細胞を用いた解析

分担研究者 松尾雅文 神戸大学医学部小児科

研究要旨

本研究は、ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を持つDMDに対してmRNA上のナンセンス変異を読み飛ばすリードスルー現象を応用しようとするものである。この目的のためには従来抗生物質のゲンタマイシンが用いられていたが、ゲンタマイシンは高い毒性を有しており、臨床の現場で応用するには課題が残されている。そのため、ゲンタマイシンにかわるリードスルー誘導薬の開発が活発におこなわれてきた。最近、ゲンタマイシンにかわる新たな化合物が発見されたので、そのリードスルー誘導によるジストロフィン発現について検討した。これまで、ゲンタマイシンによるリードスルー誘導効果の発現しやすいナンセンス変異がTGA変異を持つ患者であることを明らかにしてきており、ジストロフィン遺伝子にTGAのナンセンス変異を有するDuchenne型筋ジストロフィー患者から、筋生検によりえた筋組織を用いて培養筋細胞株を樹立し、コンパウンド2のリードスルー誘導効果を検討した。その結果、わずかながらジストロフィン発現を促進する作用を有することを示した。

A. 研究目的

Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）は男児3500人に1人が発症する最も頻度の高い遺伝性進行性筋萎縮症である。DMDはジストロフィン遺伝子の異常に起因する筋肉のジストロフィン欠損を特徴とする。多くのDMDでは、このジストロフィン欠損はジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失の異常によりジストロフィンmRNAのアミノ酸読み取り枠にずれを生

じ（アウトオブフレーム）、mRNA上にストップコドンが新たに出現し、ジストロフィン合成が翻訳の途中で停止してしまうために生じる。また、一部のDMDではジストロフィン遺伝子の1塩基置換のためにナンセンス変異を生じ、ジストロフィンの合成が停止し、そのためにジストロフィンが欠損する。現在DMDの治療として、アウトオブフレーム異常に対しては、エクソスキッピング誘導によりインフレームにかえ

る方法が、ナンセンス変異に対してはリボソームリードスルー誘導法がそれぞれ提唱されている。

本研究は、ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を持つDMDに対してmRNA上のナンセンス変異を読み飛ばすリードスルー現象を応用しようとするものである。この目的のためには従来抗生物質のゲンタマイシンが用いられていた。ゲンタマイシンの作用はリボソームRNAに結合し、ナンセンスコドンと終結因子との結合を弱め、ナンセンスコドンとどれかのtRNAとの結合を促し、新たなアミノ酸の伸長がおこりタンパクの合成が最後まで進行させるものである。しかしながら、ゲンタマイシンは高い毒性を有しており、臨床の現場で応用するには課題が残されている。

そのため、ゲンタマイシンにかわるリードスルー誘導薬の開発が活発におこなわれてきた。最近、ゲンタマイシンにかわる新たな化合物が発見されたので、そのリードスルー誘導によるジストロフィン発現について検討した。

B. 研究方法

神戸大学小児科を受診中のDuchenne型筋ジストロフィー（DMD）では遺伝子診断が進められ、ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を持つ患者が多数同定してき

た。これまで、ゲンタマイシンによるリードスルー誘導効果の発現しやすいナンセンス変異がTGA変異を持つ患者であることを明らかにしてきた。そこで、新たに発見された化合物のリードスルー誘導効果についても同じTGA変異を持つ症例を対象とした。

ジストロフィン遺伝子にTGAのナンセンス変異を有するDuchenne型筋ジストロフィー患者（KUCG****）から、筋生検によりえた筋組織を用いて培養筋細胞株を樹立した。そして、この培養筋細胞株を分化誘導培地に変更し、さらにこの培養液にリードスルー作用を有するコンパウンド2を添加した。添加後培養を24時間続けた後に以下の検討を行った。ジストロフィンモノクローナル抗体を用いてジストロフィンを免疫染色してジストロフィン発現を解析した。同時にデスミン染色も行い筋細胞を検出した。そして、両染色結果の図を重ね合わせ、筋細胞特異的に発現するジストロフィンを同定した。

C. 研究結果

その結果、コンパウンド2の添加しない培養液で培養したデスミン陽性の筋細胞は添加前はもちろん添加後もジストロフィン染色は陽性とならなかった。一方、コンパウンド2を添加した例では、添加後には筋