

1. スクリーニングに関する研究

HBV 候補薬のスクリーニング系開発とスクリーニングに関する研究

研究報告者 小嶋聡一 理化学研究所分子リガンド生物研究チームリーダー

研究協力者

後藤俊男, 山口時男, 横山茂之, 白水美香子, 臼井健悟 (理化学研究所横浜研究所)

斎藤臣雄, 結城瑞恵, 中村亜希子, 秦成陽, 山本由佳 (理化学研究所基幹研究所)

岡本晃充 (東京大学先端科学技術研究センター)

須藤正幸 (中外製薬株行会社富士御殿場研究所), 坂田幸太郎 (湧永製薬株式会社)

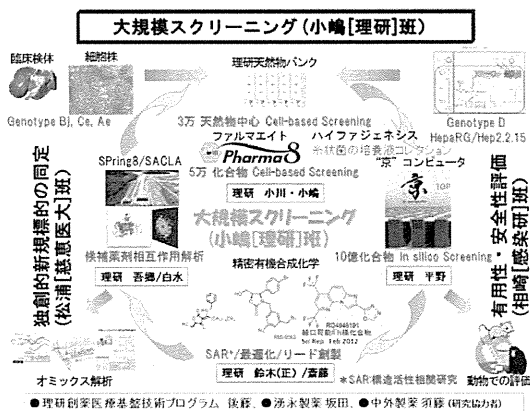
【研究要旨】

スクリーニング系の構築と研究体制の確立を目指し、化合物ライブラリーに天然化合物とその誘導体、糸状菌培養エキス計 2,000 種、カビ培養液抽出濃縮物 800 種を新たに購入、追加した。相崎グループから HepaRG/Hep2.2.15 細胞を用いる cell-based screening 系を導入し、蛍光核酸 ECHO プローブを用いる B 型肝炎ウイルス(HBV) RNA のハイスループット(HTP)蛍光スクリーニング系を確立し、Omega Amp を用いる HBV DNA の HTP 蛍光スクリーニング系確立に着手した。B 型肝炎に伴う肝線維化の原因となる TGF- β 活性化反応を抑制する薬剤候補のインシリコスクリーニング、類縁体合成、構造活性相関研究を開始し、HBV キメラマウスを用いた薬効薬理試験において抗線維化活性を確認した。さらに、Imidazonaphthyridine(RO4948191)もしくは単に RO8191)というインターフェロン様作用を示す経口剤について、類縁体合成、構造活性相関研究を開始した。

A. 研究目的

小嶋グループでは、相崎グループから導入する HepaRG/Hep2.2.15 細胞を用いる cell-based screening 系を HTP 化し、これを用いて、理研天然物化合物バンク(NPDepo), 市販並びに東大ライブラリー計 18 万化合物をスクリーニングするとともに、松浦グループで確立する我が国に多い遺伝子型発現株でも順次スクリーニングを行い、ヒット化合物、標的分子の情報を基に京コンピュータでインシリコスクリーニングを行い、誘導体

を精密有機合成し、立体構造解析して、リード化合物を得ることを目標としている。



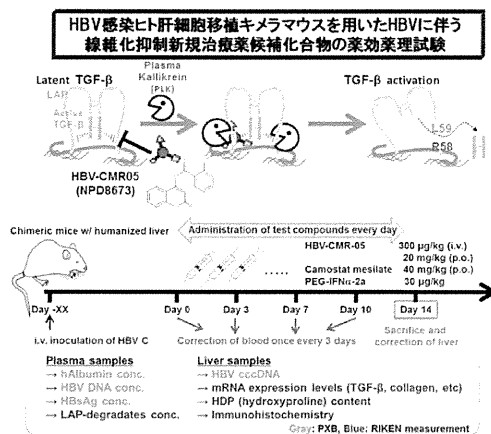
B. 研究方法

初年度となる平成24年度は、各種倫理審査へ申請し、承認を得るとともに、HepaRG細胞/Hep2.2.15細胞を用いる cell-based screening系（相崎室長報告書参照）を相崎グループから導入し、HTP化した。

具体的には、元理研（現東大先端科学技術研究センター）の岡本教授が開発した生細胞で使用可能な蛍光核酸プローブ（ECHOプローブ）を導入し、HBV RNAのHTP蛍光スクリーニング系確立を試みた。

また、理研横浜研究所の臼井ユニットリーダーが開発した短時間で溶液中のDNAを検出できる蛍光核酸プローブ Omega Ampを導入し、これを用いるHBV DNAのHTP蛍光スクリーニング系確立に着手した。

B型肝炎に伴う肝線維化の原因となるTGF- β 活性化反応を抑制する薬剤候補のインシリコスクリーニングは、分担研究者の平野研究員に依頼して実施した（平野研究員報告書参照）。同化合物の誘導体は、斎藤チームヘッドの協力をあおぎ、芳香族カルボン酸とアルコール（水酸化クマリン）との脱水縮合により合成し、TGF- β 活性化反応をミミックするTGF- β LAP切断産物生成反応の阻害でその生物活性を評価した。最も有望な化合物について、培養ラット肝星細胞系における抗線維化活性とB型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた抗ウイルス活性、ならびに抗線維化抑制活性を評価した。



RO8191の誘導体合成は、鈴木(正)チームリーダーに構造解析は吾郷専任研究員にそれぞれお願いした（鈴木チームリーダー・吾郷専任研究員報告書参照）。

（倫理面への配慮）

理研遺伝子組換え実験（承2011-060(8)）、微生物実験（12-016(4)）、動物実験（H24-2-002）、ヒト材料実験（18-13）承認済。

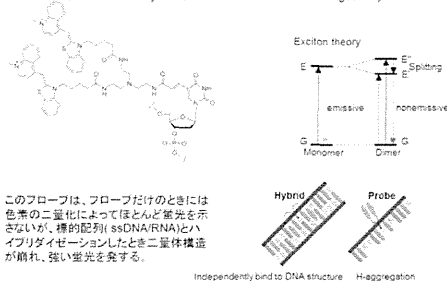
C. 研究結果

市販の化合物ライブラリーの中から、理研に既存の化合物ライブラリーにはない構造の化合物を2,000種選択して購入した。また、糸状菌のプロスライブラリーを800種購入した。これらを溶液化し、スクリーニング用プレートとして調製した。

相崎グループからHepaRG/Hep2.2.15細胞を用いる cell-based screening系を導入し、理研の技術（ECHOプローブ/Omega Amp）を駆使してHTP化して、大規模スクリーニングを開始した。

スクリーニング系のHTP化 ウィルスRNA

ECHO プロープ
ECHO: exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligodeoxynucleotide



このプローブは、プローブだけのときには色素の二量化によってほとんど蛍光を示さないが、標的配列(ssDNA/RNA)とハイブリダイゼーションしたとき二量体構造が崩れ、強い蛍光を発する。

Cooperated by Akimitsu Okamoto

スクリーニング系のHTP化 ウィルスDNA

OmegaAmpを用いたHBV-drug High-throughput Screening 協力 理研横浜OSC 臼井

【OmegaAmpの特徴】

- 等温増幅法(60℃)のみによる高効率増幅
- 40-48時間(180-480サイクル)
- 増幅効率(増幅率)が高(10倍)による高感度(100倍)検出

培養上清回収から3時間以内での384検体のDrug screeningテストが可能。

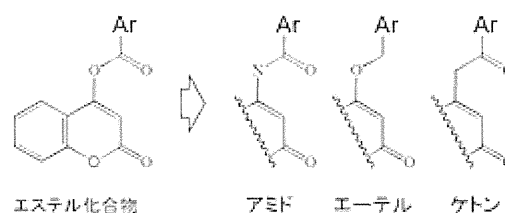
D. 考察

抗HBV化合物スクリーニングのHTP化に成功し、18万化合物を4か月でスクリーニングできる目途が立った。平成25年度中に少なくとも3クールのスクリーニングを実施できることがわかった。一方、パイロットスタディとしてB型肝炎に伴うTGF-β活性化反応を抑制するヒット化合物のインシリコスクリーニング、類縁体合成、構造活性相関研究、培養細胞実験、HBVキメラマウス実験を実施し、有望な化合物がHBVに伴う線維化抑制活性を有していることを動物実験で確認するとともに、京コンピュータを用いたインシリコスクリーニング開始から動物実験までは最短6か月で実行可能ながわかった。今後残された溶解性と安定性の問題解決に取り組む。すでに、エステル結合をアミド、エーテル、ケトンに置き換えた化合物の合成に着手しており、エステル化合物および改変化合物について、DMSOおよび水溶液中での構造安定性をNMR解析により検討する。

HBV 肝線維化抑制剤の開発では、4-または6-,7-ヒドロキシクマリンと、安息香酸やピコリン酸、フラン酸カルボン酸等の誘導体を原料として40種のTGF-β活性化反応抑制薬候補のエステル化合物を合成し、TGF-β LAP切断産物生成反応の阻害活性の評価を行い、最も有望な化合物は、大量(500mg規模)合成し、動物実験に供した。<合成化合物を次ページ別表に示す>

NMRを用いた検討からエステル化合物が加水分解を受けて分解している結果が得られ、今後の課題が明らかになった。

培養ラット肝星細胞の活性化を抑えた有望な化合物は、B型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞移植キメラマウスにおいて、抗ウイルス活性は示さなかったものの、抗線維化抑制性を示した。



E. 結論

蛍光核酸プローブを利用した抗ウイルス活性のHTPスクリーニング系を確立した。パイロット実験としてHBVに伴う肝線維化を動物実験で抑える化合物を取得した。HTPスクリーニングに4か月、インシリコスクリーニングから動物実験まで10ヶ月で終了できることがわかった。

厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書

F. 参考文献 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

山本由佳、原詳子、小嶋聡一 TGF-β活性化
反応と治療・診断への応用、医学のあゆみ「肝
線維化研究 Update—基礎から臨床へ」特集
号 244(6):533-537 (2013)

2. 学会発表

Kojima S, Sakata K, Yamamoto Y, Hara M.
“Targeting PLK-dependent TGF-β

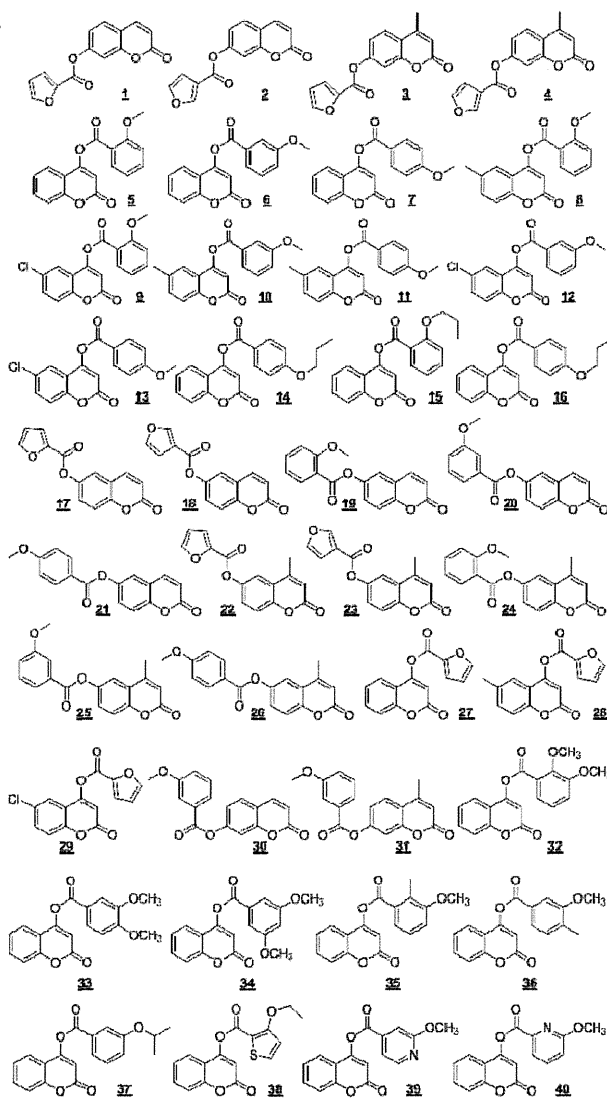
Activation Reaction” 63rd Annual
Meeting of the American Association for
the Study of Liver Diseases (The Liver
Meeting 2012) Boston, Nov 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

別表:合成化合物一覧

code No.	構造	分子量	合成量 (mg)
HEV-CMR1	<u>1</u>	765.31	165
HEV-CMR2	<u>2</u>	256.21	169
HEV-CMR3	<u>3</u>	270.24	167
HEV-CMR4	<u>4</u>	270.24	165
HEV-CMR5	<u>5</u>	803.97	122
HEV-CMR6	<u>6</u>	802.77	155
HEV-CMR7	<u>7</u>	296.27	180
HEV-CMR8	<u>8</u>	310.30	140
HEV-CMR9	<u>9</u>	330.72	115
HEV-CMR10	<u>10</u>	310.30	129
HEV-CMR11	<u>11</u>	310.30	102
HEV-CMR12	<u>12</u>	330.72	84
HEV-CMR13	<u>13</u>	330.72	87
HEV-CMR14	<u>14</u>	324.33	44
HEV-CMR15	<u>15</u>	324.33	53
HEV-CMR16	<u>16</u>	338.35	18
HEV-CMR17	<u>17</u>	258.21	29
HEV-CMR18	<u>18</u>	256.21	49
HEV-CMR19	<u>19</u>	296.27	14
HEV-CMR20	<u>20</u>	296.27	30
HEV-CMR21	<u>21</u>	296.27	90
HEV-CMR22	<u>22</u>	270.24	98
HEV-CMR23	<u>23</u>	270.24	80
HEV-CMR24	<u>24</u>	310.30	158
HEV-CMR25	<u>25</u>	310.30	86
HEV-CMR26	<u>26</u>	310.30	28
HEV-CMR27	<u>27</u>	258.21	35
HEV-CMR28	<u>28</u>	270.24	26
HEV-CMR29	<u>29</u>	290.68	44
HEV-CMR30	<u>30</u>	296.27	30
HEV-CMR31	<u>31</u>	310.30	45
HEV-CMR32	<u>32</u>	328.30	80
HEV-CMR33	<u>33</u>	328.30	25
HEV-CMR34	<u>34</u>	328.30	55
HEV-CMR35	<u>35</u>	310.30	135
HEV-CMR36	<u>36</u>	310.30	140
HEV-CMR37	<u>37</u>	324.33	90
HEV-CMR38	<u>38</u>	316.33	50
HEV-CMR39	<u>39</u>	297.26	35
HEV-CMR40	<u>40</u>	297.26	25



B型肝炎ウイルスの複製機構をターゲットとした高速評価系の構築

研究報告者 小川健司 理化学研究所分子リガンド探索研究チーム 専任研究員

共同研究者

市川保恵（理化学研究所分子リガンド探索研究チーム）

【研究要旨】

本研究の目的は、B型肝炎ウイルスの複製に働くウイルス由来タンパク質を標的とした高速評価系を構築し、HBVの感染、増殖を阻害する創薬リード化合物を探索する事にある。本研究では、HBVのヌクレオカプシドを構成し、ゲノムの複製に重要な役割を果たすCoreタンパク質に着目した。Coreタンパク質は、そのN末端に位置するアッセンブリドメインによって二量体を形成し、この二量体を単位として多量体であるヌクレオカプシドを形成する。このCoreタンパク質の分子的特徴にBimolecular luminescence complementationの技術を応用して、Coreタンパク質の二量体形成をin vitroで可視化するハイスループットスクリーニング(HTS)系の構築を試みた。分泌型の海洋性カイアシ(*Gaussia princeps*)由来ルシフェラーゼのN末端92アミノ酸およびC末端76アミノ酸の分割断片とHBV Coreタンパク質のアッセンブリドメイン144アミノ酸との融合タンパク質をコードする哺乳動物細胞発現ベクターを作製してHeLa細胞に遺伝子導入した結果、高いレベルのルシフェラーゼ活性が培養上清に分泌される事が明らかとなった。これを高速評価系に応用する事によりHBVのアッセンブリを阻害する化合物の探索が可能となった。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) は、全世界で総人口 (66 億人) の約 6% に相当する 4 億人が持続感染していると考えられている。我が国における B型肝炎ウイルス持続感染者数は 100 万人以上と言われており、これらの一部は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症する。しかし、B型肝炎ウイルスによる持続感染の成立、慢性肝炎、肝硬変および肝細胞癌の発症に関する分子機構の詳細は未だつまびらかにされておらず、これらを根本的に解決する薬剤の開発は、基礎および臨床の双方に重要であり、B型肝炎制御のために将に焦眉の急である。

本研究の目的は、B型肝炎ウイルスの複製に働くウイルス由来タンパク質を標的として、この機能を可視化するユニークな高速評価系 (HTS) を構築し、これを利用してHBVの感染、増殖を阻害する創薬リード化合物を探索する事にある。

B. 研究方法

HBVは、全長約3.2kbの環状不完全二本鎖DNAをゲノムとするDNAウイルスであり、ゲノム上には、C、P、SおよびXの4種類のORFが存在する¹⁾。C-ORFは、Coreタンパク質およびHBe抗原をコードする。P-ORFは、逆転写酵素をコードしている。

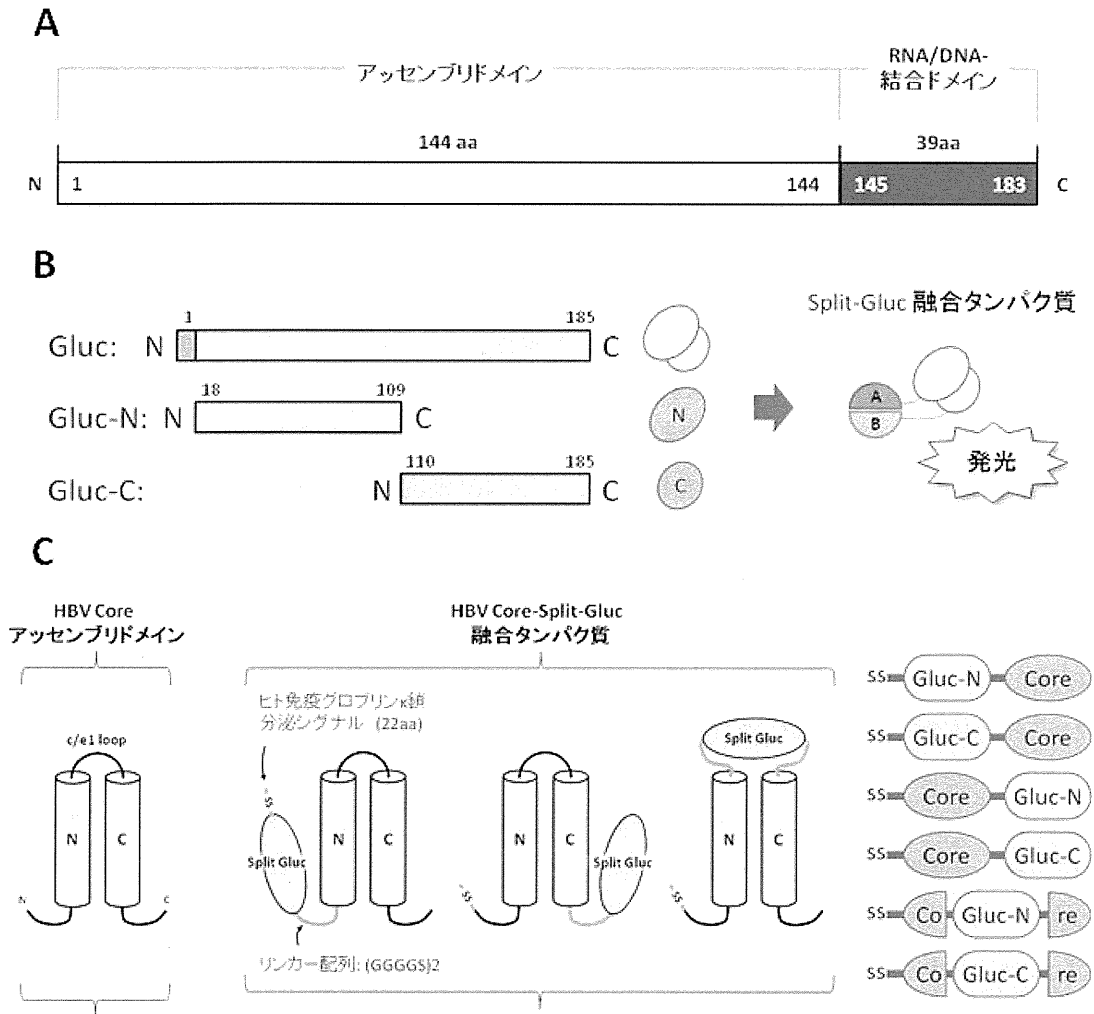


図1. HBV Core タンパク質の多量体形成を in vitro で可視化する高速評価系の構築。(A) HBV Core タンパク質のドメイン構造 (B) Split-Gluc の構造と BiLC の原理 (C) HBV Core-Split Gluc 融合タンパク質の構造

S-ORF は、エンベロープを構成する三種類の S タンパク質領域 (preS1、preS2 および S) をコードしている。X-ORF は、転写制御因子であり、肝細胞癌の成立に重要と考えられる X タンパク質をコードしている。この内ヌクレオカプシドを構成する Core タンパク質は pgRNA や P タンパク質と相互作用し、ゲノムの複製に際しては pgRNA の逆転写と 2nd strand DNA の合成に重要な役割を担っている。Core タンパク質は、全長 183

アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端のアッセンブリドメイン (1-144 残基) と C 末端の RNA/DNA 結合ドメイン (145-183 残基) からなる²⁾ (図 1A)。ウイルス感染細胞で発現した Core タンパク質は、アッセンブリドメインによって二量体を形成する。この二量体を単位として多量体が形成され、HBV のヌクレオカプシドが作られる。興味深い事に、Core タンパク質は大腸菌で強制発現させた組換えタンパク質であっても、in vitro で

カプシド様の構造を形成する³⁾。我々は、この特徴を利用し、Core タンパク質の二量体形成を *in vitro* で可視化する HTS の構築を試みた。

(倫理面への配慮)

理化学研究所遺伝子組換え実験安全委員会承認済み (承認番号: 承 2012-062(1))

C. 研究結果

二分子発光相補反応 (Bimolecular luminescence complementation; BiLC) の技術を応用し、生細胞を用いた HTS の開発を行った。分泌型の海洋性カイアシ (*Gaussia princeps*) 由来のルシフェラーゼを N 末端の 92 アミノ酸 (18-109 残基) と C 末端の 76 アミノ酸 (110-185 残基) に分割したペプチド断片は、それぞれを単独で発現させてもルシフェラーゼ活性を持たないが、結合する二つのタンパク質との融合

タンパク質として発現させると、ルシフェラーゼが再構成されて活性を示すようになる⁴⁾ (図 1B)。我々は、それぞれの断片を HBV Core タンパク質のアッセムブリドメイン 144 アミノ酸の N 末端、C 末端および c/e1 ループに相当するアミノ酸 78 から 81 残基に、フレキシブルリンカー配列 (10 残基) でつないだ融合タンパク質をコードする哺乳動物細胞発現ベクターを作製した。また、ヒト培養細胞で効率的に細胞外に分泌される様に、それぞれの融合タンパク質の N 末端にヒト免疫グロブリン κ 鎖の分泌シグナル配列 (22 残基) を導入した (図 1C)。HBV Core タンパク質は二量体を形成するので、融合タンパク質の組み合わせが適切であった場合、Core アッセムブリドメイン同士が結合する事により、Gluc が再構成されてルシフェラーゼ活性を示す様になるはずである。作製した全 6 種類の発現ベクターを図 2

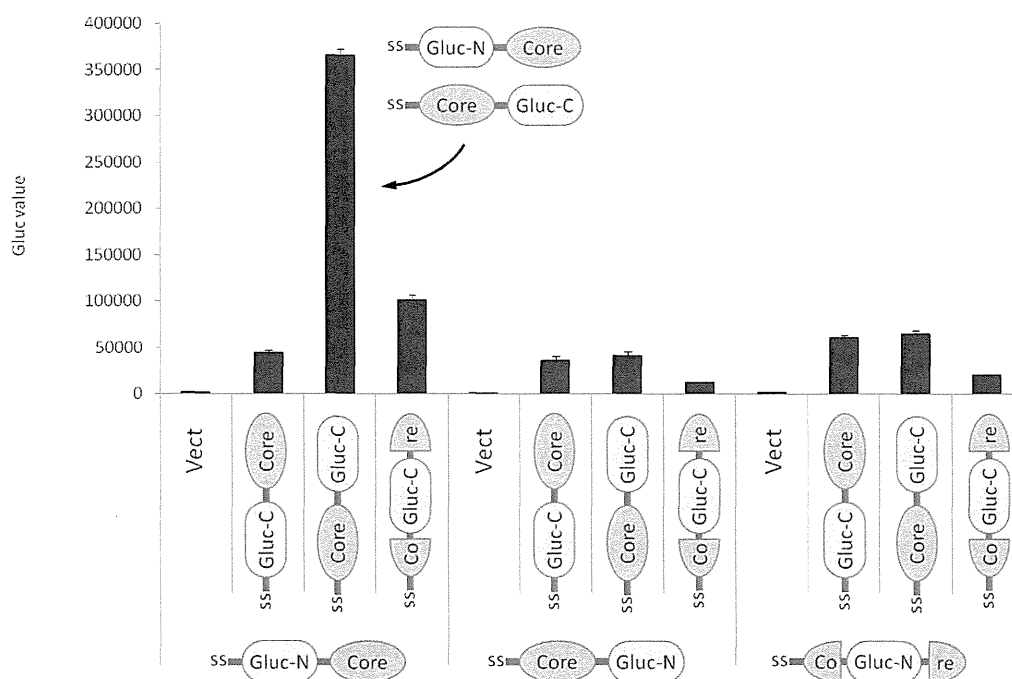


図 2. HBV Core タンパク質-Split Gluc 融合タンパク質による二分子化学発光相補反応

に示す組み合わせで HeLa 細胞に導入し、384well プレートで 24 時間培養した後、上清を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、GlucN-Core と Core-GlucC を発現するベクターを導入した場合に、培養上清に高いレベルのルシフェラーゼ活性が認められた（図 2）。

D. 考察

本研究によって明らかとなった、HBV Core タンパク質-Split Gluc 融合タンパク質の適切な組み合わせ（GlucN-Core + Core-GlucC）を HeLa 細胞に遺伝子導入した場合、24 時間後に培養上に分泌されるルシフェラーゼの活性は 350,000 と非常に高く、HTS を行うのに十分な値と言える。これにより、HBV のアッセムブリを阻害する化合物のスクリーニングが可能となった。

現在まで、HBV の治療薬として臨床応用されているものの多くは、核酸アナログを主体とした逆転写酵素阻害剤である。本研究では、基本戦略として核酸アナログ以外の化合物を探索するために、先ず逆転写酵素以外のタンパク質をターゲットとした HTS の構築を試みた。また、本研究のもう一つの基本戦略は、生細胞を用いた HTS を構築する事である。このシステムを利用する事により、細胞への浸透性に問題のある化合物や細胞毒性を示す化合物を 1 次スクリーニングで排除し、確実に生体に作用する分子を評価、選抜する事が可能となった。この HTS によって得られる化合物をリードとした新規薬剤が得られれば、従来の逆転写酵素阻害剤との組み合わせにより、より効果的な治療が行えるものと期待される。

E. 結論

本研究によって HTS が構築され、HBV のアッセムブリを阻害する化合物の探索が可能となった。平成 25 年度にはこれを用いた化合物の大規模スクリーニングを実施する。

F. 参考文献

1. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. World J Gastroenterol. 2007; 13: 48-64.
2. Kratz PA, Böttcher B, Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 1915-1920.
3. Schultz U, Grgacic E, Nassal M. Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection. Adv Virus Res. 2004; 63:1-70.
4. Hashimoto T, Adams KW, Fan Z, McLean PJ, Hyman BT. Characterization of oligomer formation of amyloid-beta peptide using a split-luciferase complementation assay. J Biol Chem. 2011; 286: 27081-27091.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

計算化学的手法を用いた B 型肝炎創薬実用化に向けた関する研究

研究報告者 平野 秀典 独立行政法人理化学研究所 研究員

【研究要旨】

計算化学的手法を用いた B 型肝炎創薬実用化に向けた創薬支援手法確立を目的として、創薬標的タンパク質を TGF- β 1 分子とした分子ドッキングを行った。その活性を制御する薬剤候補分子の探索を行うために、潜在型 TGF- β 1 分子 LAP (Latency associated protein) 部分の 56Lys-57Leu-58Arg-59Leu 付近に結合親和性を持つ薬剤候補分子の探索を行った。

A. 研究目的

TGF- β は、LAP (Latency associated protein) に包まれた不活性な「潜在型」複合体として産生される。刺激を受けると 25kD の活性型 TGF- β が潜在型複合体から放出されて受容体と結合し、様々な生理機能を発揮すると考えられている。この反応は潜在型 TGF- β 活性化反応と呼ばれ、生理的な活性化因子には、トロンボスポンジンやインテグリンなどの細胞接着分子や、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、MMP などのタンパク分解酵素などがあり、それらは臓器特異的であるとされている。

小嶋らはプラスミンと血漿カリクレインのセリンプロテアーゼ 2 種が TGF- β の放出や活性化を誘導して肝疾患に関与することに着目し、その切断部位が潜在型 TGF- β 1 分子 LAP (Latency associated protein) 部分の 56Lys-57Leu (プラスミン)、58Arg-59Leu (血漿カリクレイン) であることを見出した。

これまでに、NPDepo 10006813 という TGF- β LAP に結合し、TGF- β 活性化反応を抑える化合物が知られている。しかしながら

TGF- β -薬剤複合体構造は得られていない。

そこで、分子ドッキングを行い、複合体の構造を予測し、結合様式を予測することも本研究の目的の一つとした。

また、TGF- β の活性を制御する薬剤を探索する際には、活性型 TGF- β そのものをターゲットとするアプローチと潜在型 TGF- β 活性化反応を抑制するアプローチの 2 つが考えられる。本研究では後者を対象とした分子ドッキングを行い、TGF- β の活性を制御する薬剤候補分子の探索を行った。

B. 研究方法

分子ドッキングを行う際には、ターゲットタンパク質の立体構造と化合物の構造式(化合物ライブラリ)が必要である。TGF- β 1 タンパク質の立体構造は X 線結晶解析から得られた構造(PDB entry: 3RJR)¹⁾(図 1)を用いた。また、理化学研究所でデータベース化を行っている天然物ライブラリである NPDepo²⁾を用いた。分子ドッキングには遺伝的アルゴリズムに基づいた、低分子がタンパク質の結合部位にどのようにドッキングするかを計算するプログラム GOLD³⁾を用いた。

（倫理面への配慮）

計算機を用いる手法のため該当なし

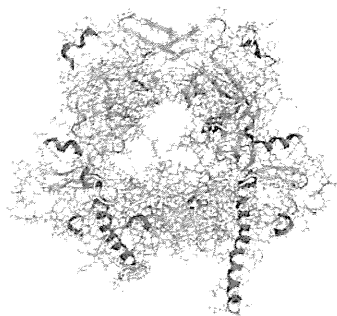


図1: TGF- β 1 タンパク質の立体構造 (PDB entry: 3RJR)¹⁾

C. 研究結果

まず、TGF- β 1 タンパク質の構造と NPDepo 10006813 および類縁化合物を用いて分子ドッキングを行い、複合体の構造を予測し、結合様式の予測を行った。その結果、図2の様な結合様式を多くとることが分かった。

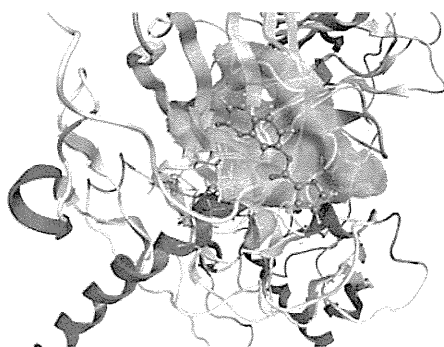


図2: 結合様式予測図。56Lys-59Leu 付近 (赤丸) が結合部位となっている。

次に、NPDepo を用いた分子ドッキングを行い、候補化合物の選定を行った。分子ドッキングの結果から候補化合物を選定する際には、スコア上位の化合物、NPDepo 10006813 および類縁化合物と似た結合様式をもつ化合物を優先した。それらの化合物に対して生化学実験を行った。しかし、NPDepo 10006813 よりも強い結合親和性を持つものを見付けることはできなかった。

D. 考察

分子ドッキングの結果、NPDepo 10006813 よりも強い結合親和性を持つものを見付けることはできなかった。今回の分子ドッキングを行う際はタンパク質の構造を1つのX線結晶解析構造、化合物データベースとしてNPDepoを用いた。このことが原因の一つと考えられる。今後はタンパク質の構造について分子動力学計算等で複数の立体構造（立体構造多形）を用意し、他の大規模化合物データベース等も考慮に入れたドッキングシミュレーションを行うことで、新規薬剤候補化合物選定へとつなげたい。

E. 結論

本研究では TGF- β 1 を標的タンパク質として分子ドッキングを行い、結合様式の予測を行った。また、その結合様式を基に、薬物候補化合物選定を行った。しかし、NPDepo 10006813 よりも強い結合親和性を持つものを見付けることはできなかった。

今後は複数の探索方法を階層的に組み合わせた薬物候補化合物群の絞り込みなどを行い、計算化学的手法を用いた B型肝炎創薬の効率化および確立を目指す。

厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書

F. 参考文献

- 1) Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA. “Latent TGF- β structure and activation” Nature (2011) **474**: 343-349
- 2) <http://npd.riken.jp/npd/ja/>
- 3) Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. “Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking” J. Mol. Biol. (1997) **267**: 727-748

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

IFN作用を示す低分子化合物の開発に関する研究

研究報告者 鈴木正昭 理化学研究所分子イメージング創薬化学研究チーム チームリーダー

共同研究者

石井英樹（理化学研究所分子イメージング創薬化学研究チーム）

伊集院良祐（理化学研究所分子イメージング創薬化学研究チーム）

【研究要旨】

新規な抗HBV薬の開発には新規なケミカルスクリーニング系の立ち上げ、抗HIVメカニズムの解明、創薬ターゲットタンパクの同定とそれに対する *in silico* スクリーニングによる探索研究が必要である。従って候補化合物の絞り込みにはある程度の時間が必要であり直に新規な候補化合物の最適化研究の実施は困難である。そこで、最近中外製薬によって報告されたインターフェロン（IFN） α 受容体2のアゴニストR04948191をベースにした抗ウイルス薬の開発を計画した。R04948191はIFN同様IFN誘導性遺伝子群（ISGs）の発現を促すことが報告されており、新規の抗HCVおよび抗HBV薬として期待できる。さらに低分子でありその作用が経口投与で発揮されたことから副作用の軽減などQOLの改善が期待できる。しかし、IFNの代わりとして使用するには、溶解性（水溶性の向上）、抗ウイルス活性などでの更なる改善が必要である。本化合物は市販（化合物名：8-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)-2,4-bis(trifluoromethyl)imidazo[1,2-a][1,8]naphthyridine）の化合物である事もあり、中外製薬での更なる開発研究の継続は断念されている。そこで本年度はR04948191の水溶性の向上を目指した極性官能基の導入に付いて検討を行った。

A. 研究目的

B型肝炎（HBV）は感染者の95%が自然治癒するが残りの5%は慢性B型肝炎となる。慢性肝炎の沈静化やその後の肝硬変、肝細胞癌への移行を防ぐために現在、①抗ウイルス療法（インターフェロン（INF）、ラミブジン、アデホビル、エンテカビルなど）②免疫賦活療法（ゲルマニウム製剤）③肝庇護療法（ウルソ[®]、強力ネオミノファーゲンシー[®]）などの治療が行われている。しかし、いずれの療法も直接ウイルスを標的にしていないため、完全に体内からウイルスを排除する事が困

難である。本研究班では新規なケミカルスクリーニング系の立ち上げ、抗HIVメカニズムの解明と創薬ターゲットの同定し、京コンピュータを用いた *in silico* スクリーニングを駆使して、HBVそのものを標的とした新規の抗HBV薬の開発を目指すものである。

そこで5年間の研究を通じて、最終的には3つ程度の新薬候補化合物を創製する事を最終目標として研究を遂行している。しかし本年度はヒット化合物の絞り込みがまだ終わっていないため、最近、中外製薬に

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

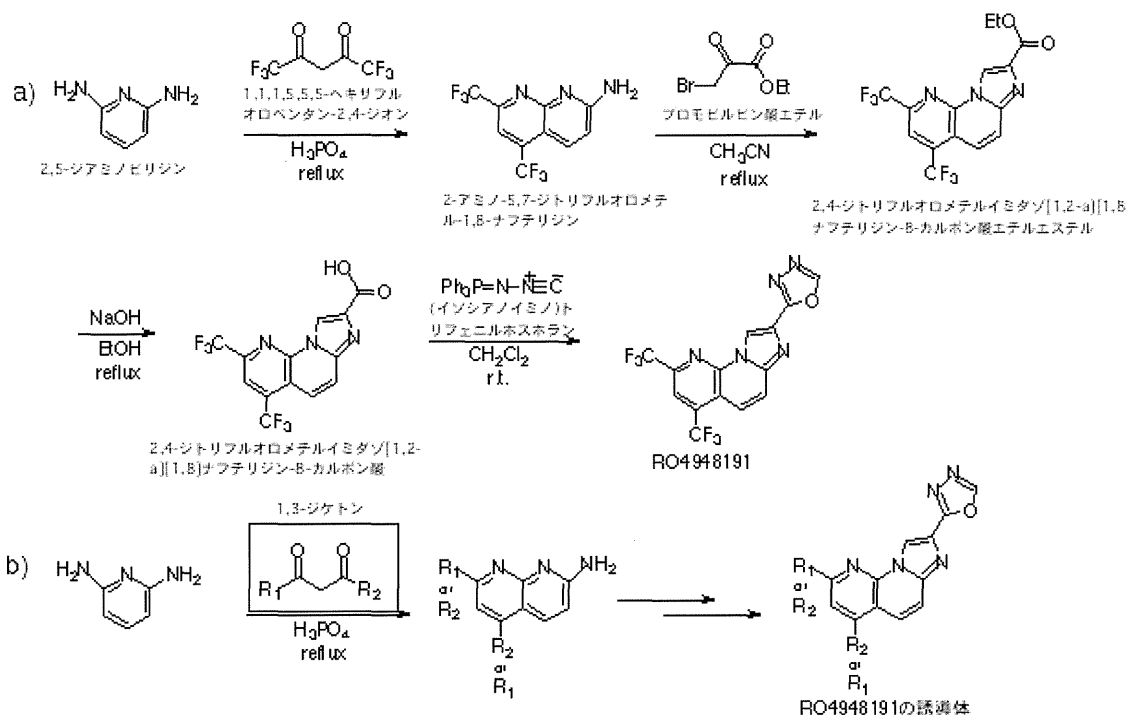


図1 RO4948191とその誘導体合成

よって報告された¹⁾インターフェロン (IFN) α 受容体2のアゴニストRO4948191をベースにした抗ウイルス薬の開発を行う事を計画した。RO4948191はIFN同様IFN誘導性遺伝子群 (ISGs) の発現を促すことから、新規の抗HCVおよび抗HBV薬として期待できる。さらに低分子でありその作用が経口投与で発揮された事から、注射による苦痛や副作用の軽減などQOLの改善が期待できる。しかし、IFNの代わりとして使用するには、RO4948191そのままの構造では水への溶解性が低く、抗ウイルス活性もそれほど高くないため、新規の抗HBV薬として使用する場合、更なる水溶性の向上と、抗ウイルス活性の向上が求められる。そこで、本年度はRO4948191をベースにした構造活性相関研究 (SAR) を実施する事にした。

B. 研究方法

RO4948191は図1に示すように、1,5-ジアミノピリジンと1,3-ジケトン (1,1,1,5,5,5-ヘキサフルオロペンタン-2,4-ジオン) をリン酸存在下で反応させ、得られた2-アミノ-5,7-ジフルオロメチル-1,8-ナフチリジンをアセトニトリル中、ブロモピルビン酸エチルと反応させイミダゾナフチリンエステルへ変換し、エステル部分の水酸化ナトリウムで加水分解し、カルボン酸体へと変換後、カルボキシル基を (イソシアノイミノ)トリフェニルホスホラン²⁾を用いて1,3,4-オキサジアゾール環へと変換する事でRO4948191を得る事に成功した (図1)。従って、1,5-ジアミノピリジンに対して反応させる1,3-ジケトンの置換基 (R₁ および R₂) を変換する事で様々な誘導体の構築が可能となった。

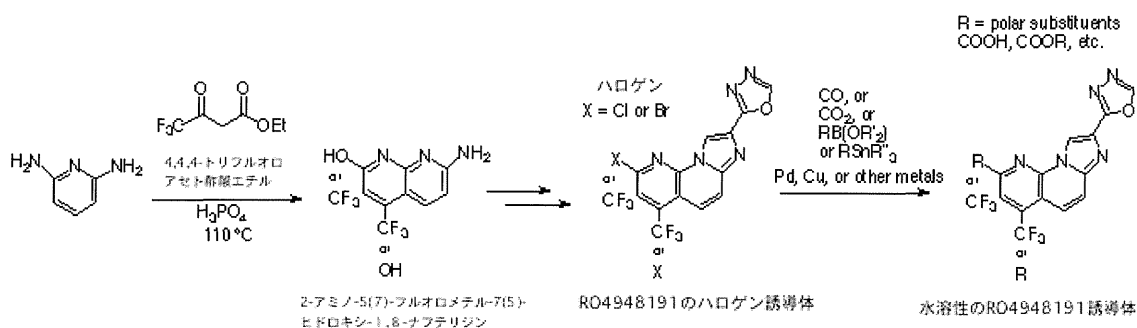


図2 R04948191 への極性置換基の導入

(倫理面への配慮) 化合物誘導体の有機合成を行う分担研究であり、倫理面に該当する実験を行っていないため該当無し

C. 研究結果

従って、上記で確立した合成法を用いて極性置換基を持った R04948191 誘導体の合成に取りかかった。まず、1,5-ジアミノピリジンと 4,4,4-トリフルオロアセト酢酸エチルをリン酸中で反応させ文献既知の 2-アミノ-5(7)-フルオロメチル-7(5)-ヒドロキシ-1,8-ナフチリジンへ変換後、³⁾水酸基をハロゲン化した後、イミダゾナフチリジン環を形成させ、1,3,4-オキサジアゾール環を導入させ R04948191 のハロゲン誘導体へと導き、有機金属の存在下、一酸化炭素、二酸化炭素もしくは適当なスズまたはホウ素化合物を用いたクロスカップリングによって水溶性を向上させた R04948191 誘導体の合成を現在展開している (図 2)。

D. 考察

現在、R04948191 のハロゲン誘導体の合成に取り組んでいるが、上記の合成ルートでは効率が悪く改善が必要と思われる。

E. 結論

今後、R04948191 のハロゲン誘導体が大量に合成できれば様々な置換基を導入した誘導体の合成が可能であり、水溶性の向上だけでなく、HBV に対する活性の向上も容易になると考えられる。

F. 参考文献

- Konishi H, Okamoto K, Ohmori Y, Yoshino H, Ohmori H, Ashihara M, Hirata Y, Ohta A, Sakamoto H, Hada N, Katsume A, Kohara M, Morikawa K, Tsukuda T, Shimma N, Foster GR, Alazawi W, Aoki Y, Arisawa M, Sudoh M. An orally available, small-molecule interferon inhibits viral replication. *Sci. Rep.* 2012; 2: 259.
- Souldozi A, Ramazani A. The reaction of (N-isocyanimino) triphenylphosphorane with benzoic acid derivatives: a novel synthesis of 2-aryl-1,3,4-oxadiazole derivatives. *Tetrahedron Lett.* 2007; 48: 1549-1551.
- Ferrarini PL, Mori C, Livi O, Biagi G, Marini AM. Synthesis of some substituted pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-ones and 1,8-naphthyridines. *J. Heterocyclic Chem.* 1983; 20: 1053-1057.

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

低分子化合物による IFN 受容体活性化の構造基盤に関する研究

研究報告者 吾郷日出夫 理化学研究所 宮野構造生物物理研究室 専任研究員

共同研究者

堀哲哉 浮田陽子（理化学研究所 宮野構造生物物理研究室）

【研究要旨】

抗ウイルス活性、抗増殖活性、免疫調節活性など多様な生物活性を持つ 1 型インターフェロン（Type I IFN）は、慢性 C 型肝炎、慢性 B 型肝炎、ある種のガンの治療等で使用されている。Type I IFN と同様の生物活性を持つ経口投与可能な薬剤は、患者の生活の質の向上、治療機会の拡大、投薬コストの削減など、様々な利点が期待できる。本研究では、Type I IFN と同様の生物活性を持つ経口投与可能な薬剤候補化合物の探索への構造情報の提供を目的とし、X線結晶構造解析等の物理化学測定により、低分子化合物による IFN α 受容体 2 の活性化機構の構造基盤の解明に取り組む。本年度は研究を行う基盤として不可欠な、IFN α 受容体 2 細胞外ドメインと IFN α の活性型組換え体の発現系を構築した。

A. 研究目的

1 型インターフェロン（Type I IFN : IFN α, β, ω ）は、多様な生物活性を持つタンパク質である。代表的な生物活性に、抗ウイルス活性、抗腫瘍活性、免疫調節活性などがある¹⁻³⁾。Type I IFN とその化学的誘導体は慢性 C 型肝炎や慢性 B 型肝炎、ある種のガンの治療で使用されている。

Type I IFN の生物活性の発現には、Type I IFN 受容体との複合体形成が必要である⁴⁾。Type I IFN 受容体には、IFN α 受容体 1（IFNAR1）と IFN α 受容体 2（IFNAR2）と呼ばれるアミノ酸配列の異なる二つの分子種が存在する。Type I IFN 受容体を介した情報伝達の主な機能単位は、IFNAR1 と IFNAR2 のヘテロ二量体に Type I IFN が結合した三分子複合体である。Type I IFN 受容体は、タンパク質リン酸化酵素結合型の膜タンパク質である。三分子複合体が作られ

ると、IFNAR1 と IFNAR2 に結合するリン酸化酵素が、IFNAR1 と IFNAR2 の細胞内領域にあるチロシン残基をリン酸化する。これにより、STAT1 や STAT2 などの転写因子が活性化し、前出の Type I IFN の生物活性発現に必要な様々な生理反応が起こる。

Type I IFN と同様の生物活性を持つ経口投与可能な薬剤は、患者の生活の質の向上、治療機会の拡大、投薬コストの削減など、様々な利点が期待できる。Type I IFN と同様の生物活性を持ち、かつ経口投与可能な低分子 RO8191 が 2012 年に報告された⁵⁾。RO8191 は、濃度依存的な C 型肝炎ウイルス複製抑制活性や RNA ゲノム複製抑制活性、さらに Type I IFN と同等の細胞保護活性を持つ。分子レベルでは、Type I IFN によって活性化する遺伝子群を濃度依存的に活性化する。このような生物活性を示す作用機序として、RO8191 による IFNAR2 の

ホモ二量体形成が提案されている。これは、IFNAR2 の細胞外ドメイン (IFNAR2-ECD) とモル比で 1:1 の複合体を形成する事⁵⁾、人為的な IFNAR2 のホモ二量体も情報伝達可能であるという報告に基づいている⁶⁾。高分子物質である Type I IFN と同様の生物活性を持ち、かつ経口投与可能な低分子が報告された事は、薬剤開発の新しい方向性を示す画期的な結果である。

本研究では、Type I IFN と同様の生物活性を持つ経口投与可能な薬剤候補化合物の探索への構造情報の提供を目的とする。Type I IFN と同様の生物活性を持つ低分子化合物の *in silico* スクリーニングや新規化合物のデザインを実施する際に、RO8191 による IFNAR2 の活性化機構の構造基盤は大きな情報源となる。例えば、RO8191 の結合によって IFNAR2-ECD が二量体を形成するか否か、形成するとすれば、そのときの IFNAR2-ECD の構造変化等である。活性化した IFNAR2-ECD の原子構造は、*in silico* スクリーニングによるリード化合物探索や、新規化合物のデザインやリード化合物の構造最適化の鋳型となる。IFN α 、IFNAR2-ECD の大量発現精製系を構築し、低分子化合物による IFNAR2-ECD の活性化機構の構造基盤を物理化学的に解明する。

B. 研究方法

RO8191 と IFNAR2-ECD の複合体結晶構造解析等の物理化学的手法を使って、低分子化合物による IFNAR2-ECD の活性化機構の解明を目指す。この目標を達成する為に (1) IFN α と IFNAR2-ECD の大量発現精製系の構築、(2) 溶液中での IFNAR2-ECD と RO8191 複合体の安定性の確認、(3) 結

晶化と構造解析を行う。今年度は IFN α と IFNAR2-ECD の大量発現精製系の構築を行った。

実験方針

高発現系の構築の目標は、発現用宿主生物で活性のある目的タンパク質を直接発現することである。宿主生物によるタンパク質の大量発現では、不活性で不溶性の封入体として発現した目的タンパク質の尿素やグアニジン塩酸塩を使った巻き戻しが用いられる事もある。巻き戻しには精製の容易さなどの利点があるが、必ずしも X線結晶構造解析に相応しい試料が得られるとは限らない。このため、第一目標は、発現用宿主生物で直接活性のある目的タンパク質を発現する事とした。

遺伝子の入手

イメージクローン cDNA コレクションからヒト由来 IFN α と IFNAR2 の cDNA を購入した⁷⁾。イメージクローン cDNA コレクションは特許等の使用制限の無い遺伝子リソースである。

発現用宿主生物と発現ベクター

Pichia pastoris (*P. pastoris*) の発現系

発現ベクターとして pPIC3.5K (インビトロジェン) を用いた。pPIC3.5K に組み込んで発現させる領域は、IFNAR2-ECD 全長 (シグナル配列を含めた前駆タンパク質のアミノ酸配列では 37 番から 232 番) とした。IFN α は成熟型タンパク質の全長 (シグナル配列を含めた前駆タンパク質のアミノ酸配列では 24 番から 188 番) を発現させる事とした。これらの目的タンパク質の遺伝子の

前後に精製タグ、タンパク質分解酵素の認識配列、分泌シグナル配列等をコードする遺伝子配列を加えた。

Brevibacillus choshinensis

(*B. choshinensis*) の発現系

pNCMO2 (タカラバイオ) を発現ベクターとして用いた。pNCMO2 は分泌発現用のベクターである。発現させるタンパク質は、IFNAR2-ECD 全長である。目的タンパク質の遺伝子の前後に、必要に応じて精製タグ等を付加した。

大腸菌 BL21(DE3)の発現系

ペリプラズムへの分泌シグナルを持つ pET-22b (ノバジェン) を用いた。発現させるタンパク質は、IFN α の成熟型タンパク質の全長である。目的タンパク質の遺伝子の前後に、必要に応じて精製タグ等を付加した。

(倫理面への配慮) この組換え実験は理化学研究所播磨研究所の承認を得て実施した。実験の課題名と承認番号は「創薬関連書タンパク質の大量発現のための DNA 組換え実験 (3)」、「申 11-03C」である。

C. 研究結果

IFNAR2-ECD の発現系の構築

P. pastoris

培養上清への IFNAR2-ECD の発現を Western Blot で確認した。実験で使用した *P. pastoris* はヒスチジン要求株である。pPIC3.5K による形質転換でヒスチジン合成能を獲得する。また、抗生物質 G418 耐性獲得する。pPIC3.5K に組み込んだコンスト

ラクトは、IFNAR2-ECD の遺伝子の 5' 側に分泌シグナルペプチドと FLAG ペプチド、3' 側にヒスチジンタグの遺伝子を持つ。*P. pastoris* を形質転換し、ヒスチジンを含まない合成培地と抗生物質 G418 を使った二段階のスクリーニングで目的遺伝子をゲノム中に持つコロニーを選択した。選択したコロニーの培養上清への IFNAR2-ECD の生産確認は、抗ヒスチジンタグ抗体を使った Western Blot で行った(図 1A)。

IFNAR2-ECD は 20°C と 30°C の両方で、complex 培地で発現が確認された。見かけの分子量は 50kDa 程であった。アミノ酸配列から計算される分子量は約 25kDa 程度である。糖鎖等の翻訳後修飾の可能性が示唆された。

分泌シグナルペプチド配列が切断されている事を確認するため、N 末アミノ酸配列解析を行った。N 末アミノ酸配列解析のため、培養上清から IFNAR2-ECD を 90%飽和硫酸沈殿、ニッケル固定カラム、ヒドロキシアパタイトカラムの順で精製した。培養上清中の IFNAR2-ECD の N 末アミノ酸配列は、分泌シグナルが切断された「ELMDYK」であった。

上記の方法で精製した IFNAR2-ECD を糖鎖切断酵素 EndoH で処理し、続いてゲル濾過カラムで分析した(図 1B)。糖鎖を切断した IFNAR2-ECD は中心分子量が 55kDa の単分散ピークとして溶出した。SDS 電気泳動で見積もった分子量は約 30kDa であった。

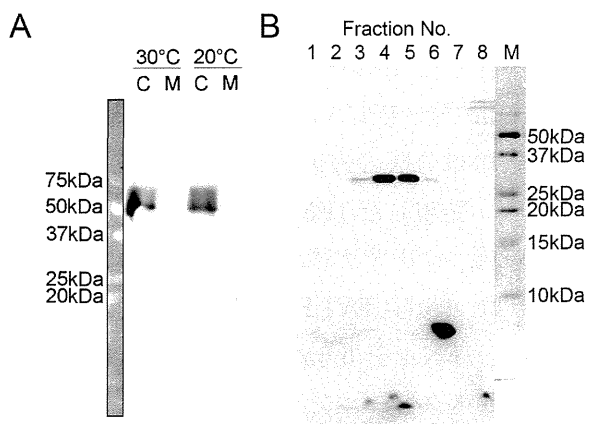


図1 *P. pastoris*で生産した IFNAR2-ECD。(A)Western blot による発現確認。「C」は complex 培地、「M」は最小培地を表す。(B)糖鎖切断処理後の IFNAR2-ECD の分析ゲル濾過の Western Blot。

B. choshinensis 分泌シグナルペプチドをコードする遺伝子の直後に、IFNAR2-ECD の遺伝子、ヒスチジンタグの遺伝子を組み込んだ pNCMO2 ベクターで *B. choshinensis* を形質転換した。培養上清への IFNAR2-ECD の発現は、抗ヒスチジンタグ抗体を使った Western Blot で確認した (図 2A)。見かけの分子量は約 25kDa であった。アミノ酸配列からの計算上の分子量は約 24kDa である。

コバルト固定カラムで精製した IFNAR2-ECD の N 末アミノ酸配列は、分泌シグナル

が切断された「AGSES」であった。

培養上清に含まれる IFNAR2-ECD は、コバルト固定カラム、ゲル濾過カラムで見かけの分子量が 32kDa の単分散の分子として精製可能であった (図 2B)。

IFN α の発現系の構築

P. pastoris

pPIC3.5K に組み込んだ遺伝子コンストラクトは、IFN α (成熟タンパク質のアミノ酸配列の 1 番から 165 番目) の 5' 側に分泌シグナル、3' 側にヒスチジンタグを持つ。P.

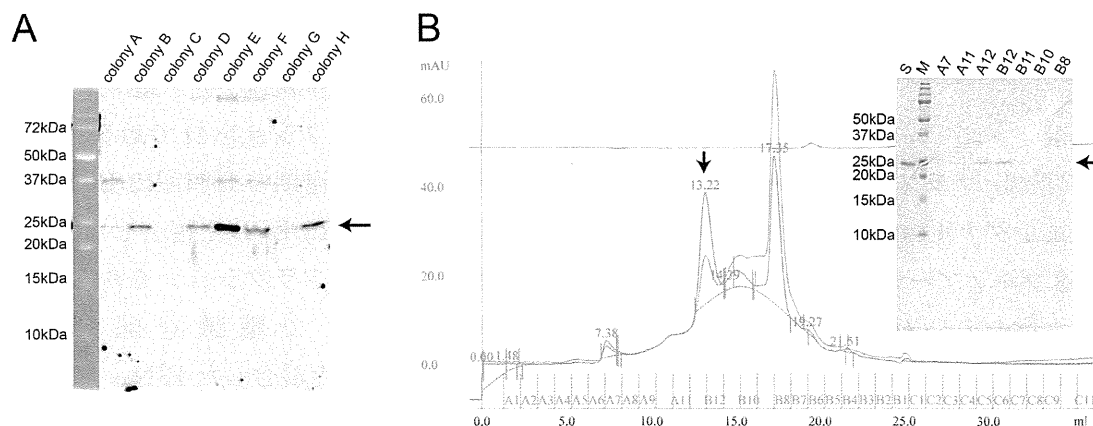


図2 *B. choshinensis* で発現した IFNAR2-ECD。(A)Western blot による発現確認。IFNAR2-ECD は 25kDa のタンパク質として発現した (←)。37kDa はコバルトトランスフェレーズ。(B)ゲル濾過による分析。コバルト固定カラムからの溶出 (S) をゲル濾過カラムで分析した。IFNAR2-ECD は単分散のピークとして溶出した (↓)。