

図3 PAINS (pan assay interference compounds)

文献17より一部抜粋，引用

する可能性も考慮すべきである。

Baellらは、スクリーニングにおいて頻繁にヒットする化合物の有する構造をPAINS (pan assay interference compounds) と名付け、分類した (図3)¹⁷⁾。PAINSには、スクリーニングに用いる検出系 (蛍光や発光、発色など) を非特異的に阻害する可能性を有する構造も含まれている。たとえば、タンパク質のシステイン残基のチオールとの反応性を有する構造があげられる。システイン残基はさまざまな酵素の活性中心に使われているため、チオールとの反応性を有する化合物は、スクリーニングにおいて擬陽性としてヒットする確率が高い。

近年、PAINSへの対策として、PAINSに分類された

化合物を抜いたライブラリーの準備が進められている。このようなライブラリーを用いることで、PAINSのヒットを免れることができる。しかし、PAINSに分類された化合物のなかにも有用なものが含まれる場合がある。Mendgenらは、PAINSとして分類された骨格であるロダニン (rhodanine) および類縁の複素五員環構造は、その高い水素結合形成性能のためにスクリーニングにおいて頻繁にヒットするものであり、非特異的な反応性などによるものではないことを報告している¹⁸⁾。われわれもロダニンを有する化合物が特異的な薬効を発揮することを見出している (後述)。PAINSを除いたライブラリーを用いるかどうかは研究者の考え方次第であるが、スクリーニングにおいて最初から

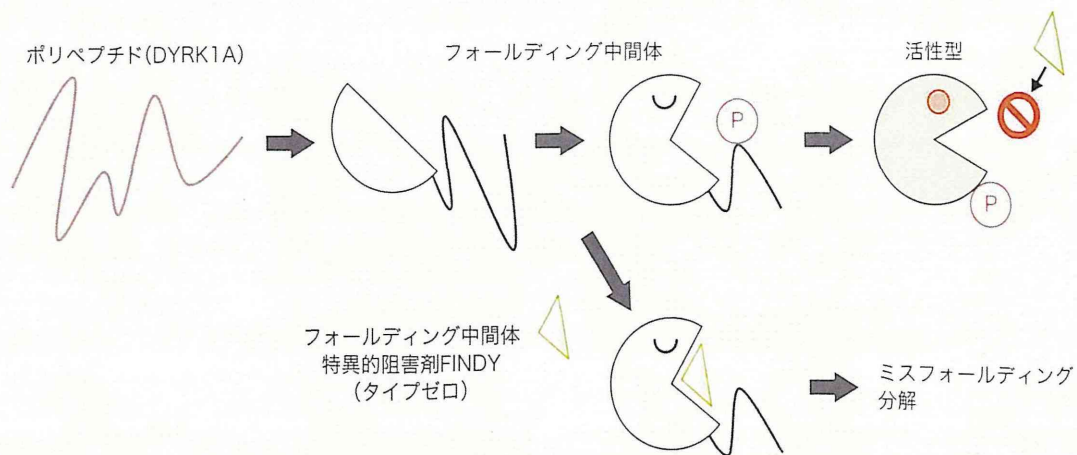


図4 フォールディング中間体特異的阻害剤FINDY

リン酸化酵素DYRK1Aのフォールディング過程の模式図。フォールディング中間体特異的阻害剤FINDYは、フォールディング中間体のATP結合部位に特異的にはまりこみ、フォールディングの進行を阻害する。FINDYの結合したDYRK1Aフォールディング中間体は、ミスフォールディングを起こし、プロテアソーム品質管理機構により分解される

範囲を狭めることは、可能性の芽を摘み取ることになりかねない。

ヒット化合物については、その構造類縁体を用いた構造活性相関解析が必要である。もし非特異的な反応性を有する構造であるならば、構造活性相関が得られない。つまりたとえPAINS構造を有するヒット化合物だとしても、構造類縁体を用いた構造活性相関が得られれば、それは非特異的な反応性ではなく、標的に対する特異的な結合によるものであると考えられる。

5 キナーゼのフォールディング中間体を標的とした特異的阻害剤の開発

われわれのグループでは、神経疾患に対する治療薬の探索を目的として、アルツハイマー病の発症に関与する微小管結合タンパク質タウをリン酸化するDYRK1Aを標的とした阻害剤の研究を進めている。精製したDYRK1Aに対する阻害活性を指標にスクリーニングを行い、INDYと名付けたDYRK1A阻害剤を同定し、その結合様式を結晶構造解析により明らかにした¹⁹⁾。

INDYは、生きた細胞内でもDYRK1Aに対して阻害活性を示した。それに対して、精製したDYRK1Aに対して阻害活性を示すほかの化合物のなかには、生きた細胞内ではDYRK1Aに対して阻害活性を示さないものもあった。これについての理由は本稿“はじめに”で

前述したとおりだと考えられる。

ここでわれわれは、この逆も起こりうるのではと考えた。つまり、精製したDYRK1Aに対しては阻害活性を示さず、生きた細胞内のDYRK1Aに対してのみ阻害活性を示す化合物が存在するかもしれない。このようなタイプの阻害剤は、精製したDYRK1Aを用いた古典的な化合物スクリーニングでは決して得られない。われわれは、生きた細胞内でのDYRK1Aによるタウのリン酸化を指標にした化合物スクリーニング系を構築し、独自の合成化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。その結果、生きた細胞内でのDYRK1Aによるタウのリン酸化は阻害するが、精製したDYRK1Aに対しては阻害活性を示さない化合物を見出すことに成功した(論文投稿中)。この化合物は、DYRK1Aのフォールディング過程に起こる分子内自己リン酸化を特異的に阻害することが明らかとなり、われわれはこの化合物をFINDY (folding intermediate-selective inhibitor of DYRK1A)と名付けた(図4)。FINDYは、4で前述したロダニンを有する化合物であり、PAINSに分類される。しかしながら、FINDYは高い特異性を有しており、DYRK1Aに近縁のDYRK1BやDYRK2に対して阻害活性を示さないうえに、さまざまなキナーゼに対しても阻害活性を示さなかった。さらにFINDYは、ツメガエル胚発生において、DYRK1A

過剰発現によって誘導される神経系の発生異常を是正した。一方、FINDYはDYRK1B過剰発現による発生異常を是正できなかった。このようにFINDYは生体内においても高い特異性を有していた。

FINDYのように、PAINSに分類される化合物でも有用性の高いものが得られることがあるため、われわれは一概にPAINSを排除する必要はないと考えている。またFINDYは高い特異性を示したことから、フォールディング過程で起こる分子内自己リン酸化を標的とすることで、ほかのキナーゼについても特異性の高い阻害剤が得られる可能性がある。これについては、今後の検討課題である。

多くのキナーゼ阻害剤は、タイプ1・2・アロステリック（タイプ3・4）と分類されてきた。しかしわれわれの同定したFINDYは、キナーゼのフォールディング過程に作用することから、前記のタイプ分類が発生する以前に阻害活性を示す。われわれはFINDYのような阻害剤は「タイプゼロ」に分類できると考えている。フォールディング過程にはさまざまな中間状態が存在すると予想されるため、今後も多くのタイプゼロ阻害剤が同定されると期待される。

おわりに

本稿では、キナーゼ阻害剤の研究開発におけるセルベースでの評価系について概説した。精製キナーゼタンパク質を用いた*in vitro*評価系の有用性は言うまでもないが、セルベースの方法を取り入れることで、アカデミアとして新しい創薬概念をつくり出すことが可能である。また、セルベーススクリーニングを構築するとき、標的キナーゼに対する阻害剤以外の副産物もヒットするよう仕組んでおく面白い。予想外の結果から新しい研究がひらけることこそ、アカデミアが創薬研究を行う価値ではないだろうか。事実、われわれもFINDY以外に興味深い（何だかよくわからない）

化合物をいくつか同定した。本稿が、これからのキナーゼを標的とした創薬研究をはじめようとしている科学者の一助となれば幸いである。

文献

- 1) 澤 匡明：『創薬支援研究の展望』（鳥澤保廣/監修）、pp106-115、シーエムシー出版、2008
- 2) Zhang, J. et al. : Nat. Rev. Cancer, 9 : 28-39, 2009
- 3) Korn, K. & Krausz, E. : Curr. Opin. Chem. Biol., 11 : 503-510, 2007
- 4) Edelman, A. M. et al. : Annu. Rev. Biochem., 56 : 567-613, 1987
- 5) Lochhead, P. A. : Sci. Signal., 2 : pe4, 2009
- 6) Lochhead, P. A. et al. : Mol. Cell, 24 : 627-633, 2006
- 7) Lochhead, P. A. et al. : Cell, 121 : 925-936, 2005
- 8) Crews, C. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 8845-8849, 1991
- 9) Greggio, E. et al. : J. Biol. Chem., 283 : 16906-16914, 2008
- 10) Kamikawaji, S. et al. : Biochemistry, 48 : 10963-10975, 2009
- 11) Noble, C. et al. : Mol. Cell, 31 : 862-872, 2008
- 12) Keshwani, M. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109 : E1221-E1229, 2012
- 13) Taipale, M. et al. : Cell, 150 : 987-1001, 2012
- 14) Taipale, M. et al. : Nat. Biotechnol., 31 : 630-637, 2013
- 15) Polier, S. et al. : Nat. Chem. Biol., 9 : 307-312, 2013
- 16) 本間直幸：蛋白質核酸酵素, 52 : 1575-1580, 2007
- 17) Baell, J. B. & Holloway, G. A. : J. Med. Chem., 53 : 2719-2740, 2010
- 18) Mendgen, T. et al. : J. Med. Chem., 55 : 743-753, 2012
- 19) Ogawa, Y. et al. : Nat. Commun., 1 : 86, 2010

<筆頭著者プロフィール>

喜井 勲：東京工業大学生命理工学研究科（工藤明教授）・博士修了/博士（理学）取得（2005年）、同・助教（～2010年）、東京医科歯科大学疾患生命科学研究所形質発現制御学（萩原正敏教授）・特任助教（～2010年）、京都大学医学研究科形態形成機構学（萩原正敏教授）・特定助教（～現在）。2010年からはじめた創薬研究、医学部でも薬学部でもない理工学部出身の自分が創薬などできるものかと思っていたが、何とかなるものである。理工学部目録での新しい創薬研究を展開中。

BIOLOGY TOPICS

選択的スプライシングを標的とした低分子化合物の医薬品開発

■ おおえ けんじ^{1,2)}。はぎわら まさとし¹⁾
大江 賢治。萩原 正敏

- 1) 京都大学大学院医学研究科 生体構造医学講座 形態形成機構学
- 2) 京都大学大学院学際融合教育研究推進センター 健康長寿社会の総合医療開発ユニット



大江 賢治
1991年 九州大学医学部卒業
2013年 より現職

Key words : chemical compound,
alternative splicing, disease

Abstract

遺伝病は、染色体や遺伝子の異常に起因する。これらの異常を正常化することは現在のところ不可能ではあるが、DNA から転写される mRNA を改変することは可能である。このような RNA を標的とした医薬品の開発は注目されており、低分子化合物と核酸医薬が研究されている。核酸医薬は克服しなければならない課題が多く、臨床応用という面では低分子化合物のほうが実現に近い。ここでは、低分子化合物の利点、選択的スプライシング機構、スプライシング阻害剤、スプライシング関連蛋白リン酸化酵素阻害剤について概説する。

はじめに

RNA を標的とする医薬品開発では、低分子化合物による低分子医薬と DNA, RNA などの核酸を利用する核酸医薬という二つの方法が考えられる。低分子医薬品は、創薬ターゲットが枯渇しつつあるという問題が指摘されているが、本稿で紹介するように、今まで注目

されていなかった選択的スプライシングを標的にすることが可能であり、新しい医薬品開発につながる可能性が大きい。一方、核酸医薬は、核酸が特定の臓器に集積してしまう、細胞内移行、安定性の問題など、現状では非常に高価であることも念頭におかなければならない(表)。

1. 選択的スプライシング機構

選択的スプライシングにより1個の遺伝子から多様な蛋白質が創出されるが、エクソンスキッピング、相互排他的エクソン、選択的5'スプライス部位、選択的3'スプライス部位、イントロン保持など mRNA の様々なスプライスバリエーションが生じる(図1A)。これらの選択的スプライシングを制御する RNA 結合蛋白は、しだいにわかってきているが謎の部分はまだ多い。ヒトゲノム計画の完了から10年経っているが、複数エクソンを有する遺伝子のうち、このような選択的スプライシングされるものの割合は、92-94%であることがわ

Drug development of alternative splicing-targeted small chemical compounds : Kenji Ohe^{1,2)}, Masatoshi Hagiwara¹⁾,

1) Department of Anatomy and Developmental Biology

2) Training Program of Leaders for Integrated Medical System for Fruitful Healthy-Longevity Society (LIMS)
Kyoto University Graduate School of Medicine

表 低分子医薬品と核酸医薬品の比較

	低分子医薬品	核酸医薬品
利点	<ul style="list-style-type: none"> ● 経口投与が可能 ● 用量設定がしやすい ● 生産コストが安価 	<ul style="list-style-type: none"> ● 作用機序が明確(既知の塩基配列やタンパク質を標的とするため)
問題点	<ul style="list-style-type: none"> ● 創薬ターゲットが限られつつある(しかし、RNAの分野では新たな展開が期待される) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 標的臓器へのターゲティング(肝・腎・脾に集積してしまう) ● 細胞内への移行が悪い ● ヌクレアーゼに対する安定性 ● インターフェロン応答、補体活性化、血液凝固時間延長 ● Off-target効果 ● 現状では非常に高価

かって、ますます選択的スプライシングの重要性が増してきている。選択的スプライシングの制御はおもにセリン・アルギニンに富むドメインをもつ蛋白質群 (SR 蛋白) と転写されたばかりの RNA に結合するヘテロ核内リボ蛋白質群 (hnRNP) の拮抗作用により、エクソン上流のスプライス部位への U2AF とエクソン下流のスプライス部位への U1 snRNP の結合が決まり、エクソンの含有・除外が決定される。すなわち、エクソン含有に働く SR 蛋白は選択的スプライシングにおいて重要な役割を果たしている。その SR 蛋白を特異的にリン酸化する酵素に Clk (Cdc2-like kinase), Dyrk (dual-specificity tyrosine- (Y) -phosphorylation-regulated kinase), SRPK (SR protein-specific kinase) ファミリーが知られている (図1B)。

2. 疾患とスプライシング関連低分子化合物

1) デュシェンヌ型筋ジストロフィーと TGO03

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、出生男児の 3500 人に 1 人の割合で発症し、最も頻度の高い重篤な遺伝性筋疾患である。DMD に対する有効な治療はなく、世界中の研究者が様々な研究を行っている。筋細胞を保護するジストロフィン蛋白質をコードする遺伝子の遺伝子変異による停止コドンやアミノ酸読み取り枠のずれによる下流の停止コドンが生じるとナンセン

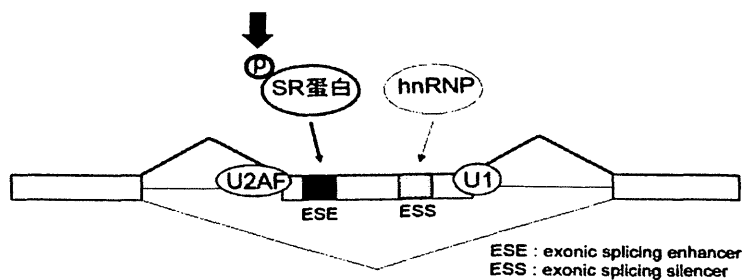
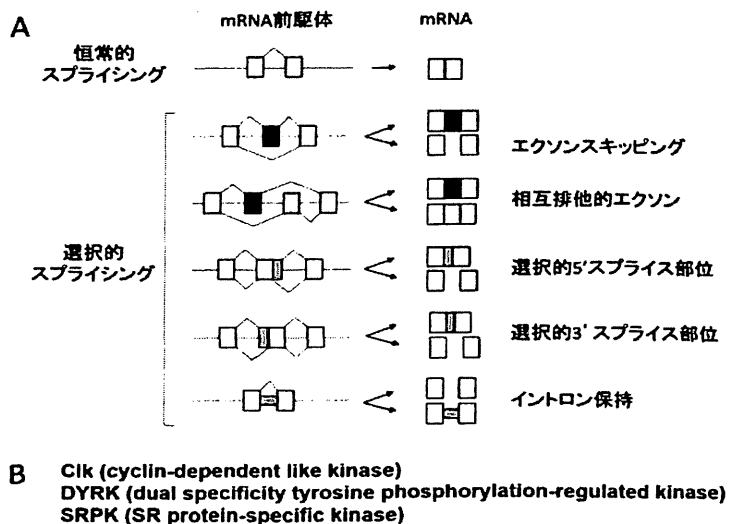


図1 選択的スプライシングと SR 蛋白特異的リン酸化酵素

ス変異依存 mRNA 分解機構等によりジストロフィン蛋白質の発現が低下し、進行性に筋萎縮が進行する。この停止コドンによる異常を回避するために人為的に停止コドンを含んだエクソンをスキップすれば、除外されたエク

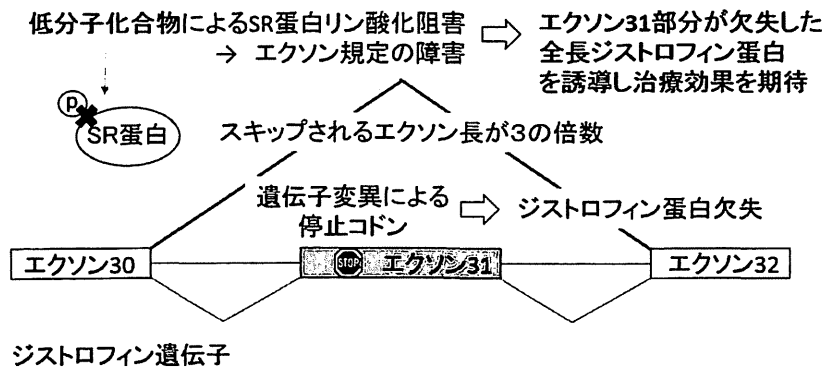


図2 低分子化合物によるエクソンスキッピング誘導治療（デュシェンヌ型筋ジストロフィー）

ソンが3の倍数に限り、アミノ酸読み取り枠が保たれたままの内部が一部欠失した全長ジストロフィン蛋白質を回復させることが可能となる（エクソンスキッピング誘導治療）（図2）。スキップさせるエクソンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによる方法が研究されてきたが、表1に示したように低分子化合物による治療が確立されれば、臨床応用はより近くなる。われわれの研究室において見つけたTG003は、選択的スプライシングの改変を示した最初のClk（Cdc2-like kinase）阻害剤である²¹。このTG003は、ジストロフィン遺伝子のエクソン31に遺伝子変異（c.4303G>T、停止コドンとなる）を有するDMD患者において、エクソン除外により全長ジストロフィン蛋白質の発現を増強することを報告した²²。この効果は、遺伝子変異のないエクソン31では認められず、ジストロフィン遺伝子の他のすべてのエクソンにも認めなかった。また、エクソン27に変異をもつDMD患者においてもTG003の効果を認めた。エクソンスキッピング誘導治療が低分子化合物により可能であることを世界に先駆けて示した。

2) ダウン症候群とINDY

ダウン症候群は、体細胞の21番染色体が1

本余分に存在するトリソミーを持つことにより発症する。染色体異常による遺伝性疾患の中では、一番頻度が高い。SR蛋白質リン酸化酵素のDYRKファミリー（図1B）の一つであるDyrk1Aは、脳の正常な発達と機能に重要なセリンスレオニンキナーゼである。Dyrk1A遺伝子は、ダウン症候群において21番目の染色体のトリソミーとなる部分に存在し、ダウン症候群において過剰発現していることが知られており、その過剰発現マウスでは、ダウン症候群にみられる脳の形態異常、学習や運動機能の獲得障害を認める。実際、ダウン症候群のヒト胎児脳組織においてSR蛋白のリン酸化状態の増強を認め、脳の形成や機能に重要なチロシンキナーゼB（TRKB）遺伝子やコリン作動性神経系に重要なアセチルコリンエステラーゼ（AChE）遺伝子の異常スプライシングが認められる。われわれの研究室において、Dyrk1Aを阻害する低分子化合物をスクリーニングしたところ、INDY（Inhibitor of Dyrk）を同定し、Dyrk1AのATP結合ポケットに結合することを示した。INDYは、タウ蛋白質の異常リン酸化を抑制し、Dyrk1AによるNFATシグナル系の抑制を解除する。重要なことは、INDYのプロドラッグが、毒性を示さずにアフリカツメガエル初期胚で過剰発

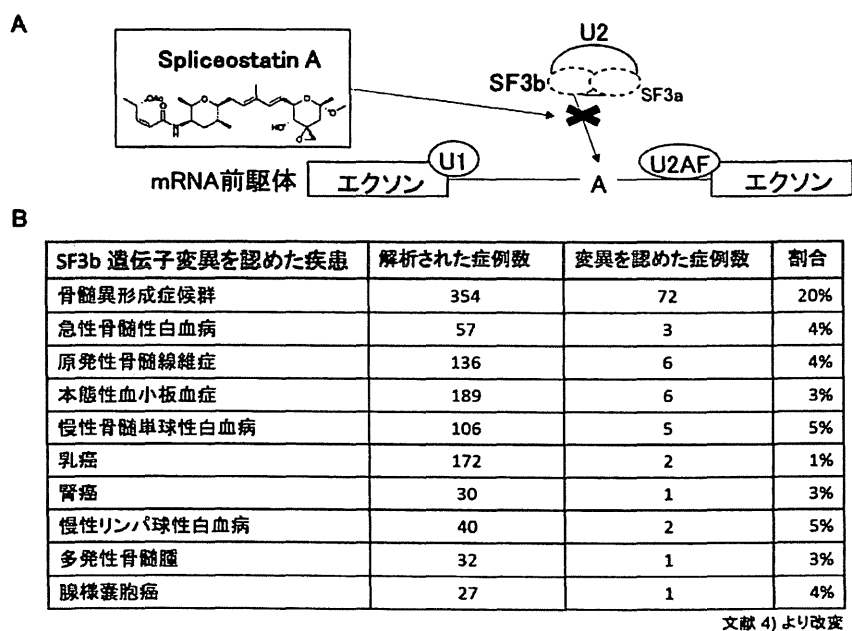


図3 Spliceostatin A のスプライシング複合体への作用点と癌における SF3b 変異

現した Dyrk1A による異常形質を改善したことである³⁾。Dyrk1A の過剰発現は、脳腫瘍の中でもっとも予後の悪い膠芽腫 (Glioblastoma multiforme) においても認められ、Dyrk1A の阻害が、EGFR 依存性の膠芽腫に対する治療としての可能性も見出している⁴⁾。

3) ウイルス感染症と SRPIN340

ウイルスの中には、宿主の RNA スプライシング機構を利用し SR 蛋白のリン酸化により、その発現が制御されているものがある。とくに HIV は、選択的スプライシングにより自身のウイルス蛋白の多様なパーツを作り出すことが知られている。われわれの研究室では、HIV の発現が、SRPK (SR Protein-specific Kinase) ファミリーの一つである SRPK2 による SRp75 のリン酸化により 20 倍も上昇することを見つけ、さらに SR protein phosphorylation inhibitor 340 (SRPIN340) が、SRPK2 を阻害し HIV の産生を抑制し治療への可能性を見

出している。HIV 以外にサイトメガロウイルスなどの急性ウイルス感染に関連するものにも効果がある可能性を報告した⁵⁾。C 型肝炎ウイルスの複製にも、SRPK の発現が関与し SRPIN340 によって抑制される。その他にも、SRPIN340 の周辺化合物でデングウイルスの形成を阻害するものを見つけている。また、SRPK1 は、パピローマウイルス、ヘルペスウイルス、B 型肝炎ウイルスのウイルス蛋白と相互作用して、宿主やウイルス自身のスプライシングやスプライシング因子のリン酸化状態に影響し、ウイルス蛋白の発現に利用されているので、SRPIN340 による治療が期待できると考えられる。また、SRPK の発現は膵癌、乳癌、大腸癌、成人 T 細胞性白血病において発現上昇が認められており、SRPK1 のノックダウンによる細胞増殖抑制、アポトーシスや抗癌剤への感受性改善などの事象が、異常スプライシングの是正に関連していることが報告されている。

4) 骨髄異形成症候群と Spliceostatin A

骨髄異形成症候群では、骨髄造血幹細胞において異型クローンが生じ、正常幹細胞の造血を抑制する。骨髄は異型クローンにより過形成となるが、アポトーシスが亢進しているため、血球減少をおこす。この異型クローンにさらに異常が加わると急性骨髄性白血病となる。長らくその原因は謎であったが、スプライシング因子の遺伝子変異が見つかった⁶⁾。遺伝子から mRNA 前駆体が転写され、5' スプライス部位が U1 snRNP に、ブランチ部位が U2 snRNP によって認識され、スプライシング複合体によりイントロンが取り除かれるが、この U2 snRNP を構成する SF3b という因子の遺伝子変異である。スプライシング阻害剤である Spliceostatin A (SSA) は、シュードモナス属のグラム陰性桿菌の培養液から単離された FR901464 のメチル化誘導体であり、この SF3b に結合する⁷⁾ (図 3A)。SSA により、mRNA 前駆体のスプライシングおよび核内保持が障害されるが、U2 snRNP の機能を完全に阻害すれば細胞は機能できなくなる。しかし、SSA の SF3b への結合により、U2 snRNP はブランチ部位の上流に結合が生じ、その親和性により SSA に反応するイントロンと反応しないイントロンが生じる⁸⁾。このような驚くべき性質に加え、SSA の治療薬としての可能性もわかってきている。すなわち、骨髄異形成症候群患者のエキソーム解析より SF3b の遺伝子変異が明らかとなったが⁶⁾、骨髄異形成症候群以外の癌でも変異が発見されている⁹⁾。(図 3B)。従って、これらの癌において SF3b は癌治療の標的であり、SSA などの SF3b に結合する低分子化合物が SF3b の遺伝子変異に

よる異常スプライシングを改変することによりアポトーシスを誘導し、治療につながる可能性があるとして世界中で研究が進められている。

おわりに

低分子化合物は医薬品として古くから知られているが、スクリーニング方法の工夫により RNA や本稿に述べた選択的スプライシングを標的とした医薬品開発など新しい分野が開拓されつつある。とくにわれわれが開発した複数の蛍光蛋白質を用いた選択的スプライシングの可視化技術¹⁰⁾は、細胞において、スプライシング・レポーターによるスプライスバリエーションを緑色や赤色の蛍光蛋白質により観察を可能にしており、スクリーニングに使用している。選択的スプライシング関連低分子化合物の医薬品開発が飛躍的に進むと確信している。

文 献

- 1) A. Nishida *et al.*, *Nat. Commun.* 2, 308-315, 2011
- 2) M. Muraki *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279, 24246-24254, 2004
- 3) Y. Ogawa *et al.*, *Nat. Commun.* 1, 86, 2010
- 4) N. Pozo *et al.*, *J. Clin. Invest.* 123, 2475-2487, 2013
- 5) T. Fukuhara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11329-11333, 2006
- 6) K. Yoshida *et al.*, *Nature* 478, 64-69, 2011
- 7) D. Kaida *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* 3, 576-583, 2007
- 8) A. Corrionero *et al.*, *Genes Dev.* 25, 445-459, 2011
- 9) E. Papaemmanuil *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 365, 1384-1395, 2011
- 10) H. Kuroyanagi *et al.*, *Nat. Protoc.* 3, 909-915, 2006

