

論理的創薬による蛋白質立体構造制御法の確立とプリオン病治療薬開発への応用

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)

研究体制

総括 桑田 一夫[岐阜大学]

西田 教行[長崎大学]

※平成21年度における研究体制

プリオン病治療薬の開発へ大きく前進

Project KeyWord
キーワード

プリオン病

クロイツフェルト・ヤコブ病、新変異型ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病などの総称で、プリオンタンパク質が異常構造に変換することにより、発症します。現時点において、確立された治療法はありません。

論理的創薬

病気の原因となるタンパク質等の構造に基づき、論理的に薬剤構造を決定する手法です。4つのプロセス(立体構造決定、創薬計算、有機合成、生物試験)より構成され、非経験的に有効な薬剤を創製することができます。

統合創薬ソフト「NAGARA」

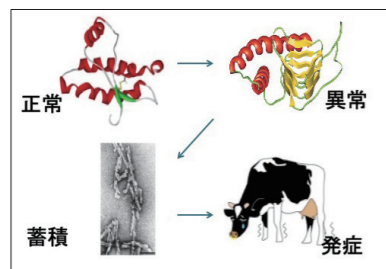
論理的創薬のなかめとなるソフトウェアで、リード探索及びリードの最適化が行えます。複数のモジュールから構成され、一般のユーザーにも使いやすいグラフィック・ユーザー・インターフェースを備えています。

1 研究の背景・意義

プリオン病の克服に向けて

プリオン病は、神経変性疾患のなかでも特に症状の進行が速く、また感染性が唯一証明されている疾患です。約100万人に1人という希少疾患ではあるものの、誰もが罹患する可能性があり、現時点においては確立された治療法はありません。硬膜移植やBSE問題にみられるように、医療や食の安全といった国民生活と密接に関わる疾患でもあります。

これまでの研究より、プリオン病の病原体は、異常構造に変換したプリオンタンパク質であることが証明されました(図参照)。従って、異常構造への変換を抑えるような低分子化合物を創製できれば、プリオン病治療薬の開発につながる、と考えられます。プリオンタンパク質は、酵素ではないため、従来の酵素阻害剤開発で使用されてきた手法をそのままでは適用できません。しかし、正常型の立体構造は判明しているため、計算機を用いて異常化を抑制する低分子化合物の設計を行うことは、理論的に可能と考えられます。有効な抗プリオン物質が発見され、脳への移行性や安全性を確認できれば、プリオン病治療薬として実際に臨床の場で使用できるようになります。さらに、論理的創薬手法が方法的に確立されれば、この様な新しいコンセプトに基づく難治性疾患治療薬開発への道が開ける、と期待されます。



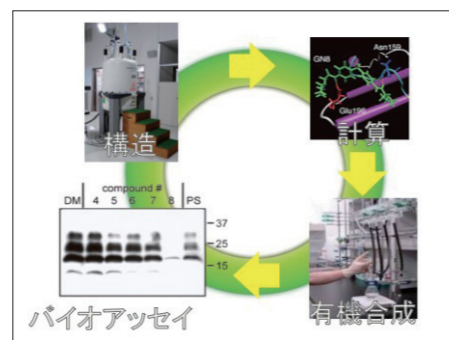
◀正常型プリオンタンパク質は、何らかの原因で異常型構造に変換されます。異常型が脳に蓄積することにより神経変性が進行します。

2 研究プロジェクトの目標

プリオン病治療薬の開発

プリオン病治療薬の開発を、論理的創薬法によって行います。論理的創薬法は、4種類のプロセスよりなります。すなわち、(1)プリオンタンパク質の立体構造、及びダイナミクス決定、(2)立体構造に基づく創薬計算、(3)計算機が設計した化合物の有機合成、(4)合成した化合物のバイオアッセイ(持続感染細胞培養試験、感染動物治療実験、薬効の確認)です(図参照)。さらに、バイオアッセイで有効な化合物が見つければ、(1)に戻り、タンパク質との複合体の立体構造の決定を行います。これらのプロセスを何度も繰り返すことにより、より有効な薬剤を開発するというのが論理的創薬法です。

プリオンタンパク質の場合、立体構造はNMRを用いて既に決定されており、詳細なダイナミクス測定を行うことにより、構造的に特に脆弱な部位を特定することが出来ました。この部位を標的として、計算機によるスクリーニングを開始しました。

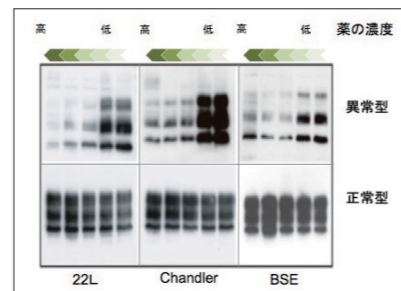


▲論理的創薬法による治療薬開発。①構造決定、②創薬計算、③有機合成、④生物試験、の4種類の工程よりなります。

3 研究プロジェクトの成果

プリオン病に対する有効性を確認

プリオンタンパク質は、稀に起きる地震のような立体構造の揺らぎにより、別の立体構造(例えば異常構造)へと変化します。この原因になる脆弱部位を、NMR(核磁気共鳴法)により特定しました。これに基づき、独自の創薬計算により、低分子化合物の設計(リード化合物:GN8)に成功しました。実際に有機合成を行い、プリオン持続感染培養細胞に投与すると、異常型プリオンの減少が認められました(図参照)。GN8の特徴は、どの異常プリオン株に対しても、一様に抑制効果を有するところ



にあります。また、異常型構造も、徐々に代謝・分解されてゆることが分かりました。

◀プリオン感染細胞に対する、抗プリオン薬の効果(ウエスタン・プロット)。GN8を投与すると、異常型(黒い部分)が減少します。一方、正常型には変化がありません。

統合創薬ソフト「NAGARA」を開発

論理的創薬を行うための統合創薬ソフト「NAGARA」を開発しました。「NAGARA」は、これまでに抗プリオン化合物の論理的創製のために開発してきたプログラムを、一般のユーザー向けに統合した創薬計算専用のソフトです。「NAGARA」は、グラフィック・ユーザー・インターフェース(DEGRAS)、化合物ライブラリー(DEVOON)、(1)古典計算モジュール、(2)粗視化モデル計算用ソフト(MARVIN)、(3)量子化学計算用ソフト(フラグメント分子軌道法、PAICS)より構成されており、低分子化合物の設計、最適化、タンパク質立体構造安定化作用の評価を行うことが可能です。

創薬ソフトNAGARA

全原子分子動力学計算

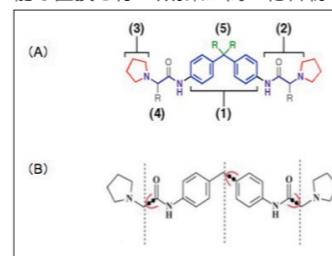
粗視化分子動力学計算(MARVIN)

分子軌道計算(PAICS)

▶統合創薬ソフト「NAGARA」は、全原子分子動力学計算(古典計算モジュール)、粗視化モデル計算、分子軌道計算より構成されます。

プリオン病治療薬候補化合物の最適化

抗プリオン・リード化合物GN8は、大きく5つの部分に分かれます(図A)。(1)中央のジフェニルメタン骨格は、抗プリオン活性に必須です。(2)ビス(エチレンジアミン)骨格も必須です。(3)両端に疎水性の置換基が必要です。(4)カルボニル基のα位の置換基は、重要ではありません。(5)ベンジル位に置換基を導入すると、活性が向上します。これらの情報に基づきGN8を図Bのように4つのパートに分け、有機合成可能な置換を行い、効果が高い化合物を「NAGARA」により選定し、さらに有機合成した結果、当初のリード化合物よりも、現時点で約4倍活性の高い化合物を合成出来ました。



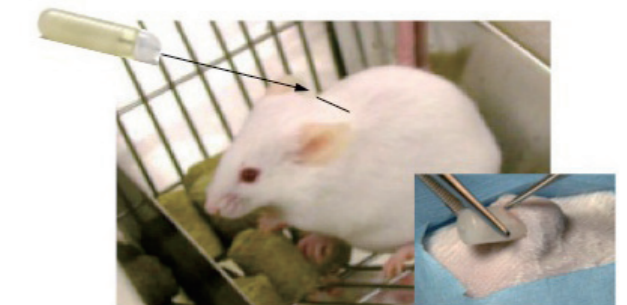
◀抗プリオン作用を有するリード化合物GN8の化学構造とその最適化方法。GN8を4つの部分に分け、それぞれの効果を評価します。

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

抗プリオン化合物の最適化及び安全性の検証

抗プリオン化合物を細胞実験により最適化した後、動物実験により実際の治療効果及び安全性を確認します。抗プリオン・リード化合物であるGN8を、プリオン感染マウスに皮下投与すると、生存期間が約2週間延長しました。従って、GN8は脳血液関門を通過することができ、末梢投与でも有効であると考えられます。さらに、正常マウスに皮下投与し安全性試験(非GLP)を行った結果、副作用はほとんど認められませんでした。

今後、論理的創薬手法によりリード化合物であるGN8の化学構造を最適化し、薬理効果及び脳内移行の効率を高め、安全性をさらに詳しく動物実験によって確認する予定です。これらが成功すれば、臨床研究、臨床試験などを経て、開発された化合物をプリオン病治療薬として臨床応用することが可能になる、と期待されます。

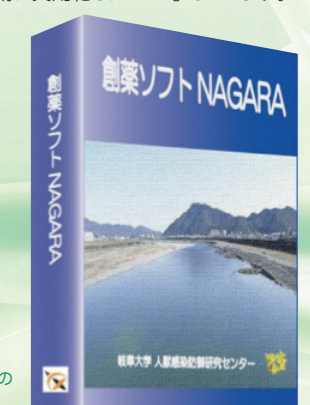


▲最適化した薬剤を用いて、プリオン感染マウスの治療実験を行います。より高い治療効果と安全性試験を動物実験により検証します。

創薬ソフト「NAGARA」の製品化

創薬ソフト「NAGARA」は、抗プリオン化合物の発見及び最適化に有用であることが分かりました。このことはプリオン病のみでなく、タンパク質のミスフォールディングが原因で起こる他の疾患、例えば、アルツハイマー病などの神経変性疾患、p53の立体構造異常により生ずるがんなどの腫瘍性疾患、アミリンなどの蓄積が原因となるII型糖尿病、自己免疫疾患、先天性酵素欠損など多くの内科疾患にも「NAGARA」が適用可能であることを示唆しています。

従来の方法では、酵素阻害剤の設計しか行えませんでした。従って、「NAGARA」を用いることにより、このように多くの疾患治療薬の開発が原理的に可能となります。従って、「論理的創薬法」を出来るだけ多くの研究者にご利用いただき、難病の治療薬を一日でも早く開発するために、創薬ソフト「NAGARA」を早期に実用化したいと考えています。



▶創薬ソフト「NAGARA」のパッケージ(イメージ図)。

参考文献

Kazuo Kuwata, Noriyuki Nishida, Tomoharu Matsumoto, Yuji O. Kamatari, Junji Hosokawa-Muto, Kota Kodama, Hironori K. Nakamura, Kiminori Kimura, Makoto Kawasaki, Yuka Takakura, Susumu Shirabe, Jiro Takata, Yasufumi Kataoka, and Shigeru Katamine
Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 11921-11926, 2007

Junji Hosokawa-Muto, Yuji O. Kamatari, Hironori K. Nakamura, Kazuo Kuwata
A Variety of Anti-Prion Compounds Discovered through an in silico Screen Based on PrPc Structure: A Correlation Between Anti-Prion Activity and Binding Affinity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC) 53: 765-771, 2009

Takeshi Ishikawa, Takakazu Ishikura, Kazuo Kuwata
Theoretical study of the prion protein based on the fragment molecular orbital method. Journal of Computational Chemistry, in press