

腎炎治療分子標的医薬の開発

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)

研究体制

総括 辻本 豪三[京都大学]

※平成21年度における研究体制

腎炎治療分子標的医薬の開発

Project
KeyWord
キーワード

ゲノム創薬

人の遺伝子情報(ゲノム)を基に、治療疾患遺伝子を見出し、創薬を行うことで、効率的な医薬品開発を目指す研究。

分子標的医薬品

体内の特定の分子を狙い撃ちしてその機能を抑えることにより病気を治療する医薬品のこと。最新の医学・薬学の知見に基づき、創薬段階から分子レベルの標的を定めています。

腎炎

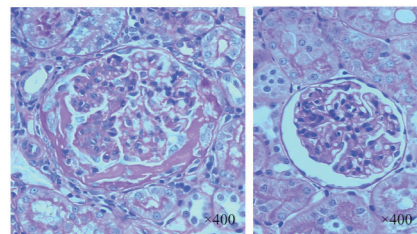
腎臓に起こる炎症の総称。主に糸球体に炎症反応がみとめられるものを糸球体腎炎と呼びます。現在、特効薬となる治療法は存在せず、病状の進行を抑える対症療法的な治療が主流となっています。

1 研究の背景・意義

腎炎の克服に向けて

我が国における腎疾患患者は、透析導入以前の約25万人と透析患者の23万人からなり、毎年約3万4千人が透析治療へ新規導入されています。腎炎は積極的な早期治療により腎不全への進展を遅延または抑止できることから、その早期発見・早期治療が最も重要ですが、現在腎炎の薬物治療は免疫抑制剤による姑息的炎症抑制が主であり、未だ有効な治療法を欠いています。また、QOL(Quality of Life)や、現在1兆円を超える医療財政という観点からも効果的な腎炎治療法の開発が望まれていました。

近年、腎炎等の“一般的疾患”は単一遺伝子疾患ではなく、環境因子と遺伝因子の複合的機序により発症する多因子疾患であることが明らかとなってきています。これまで多因子疾患の病態解析に有効な方法論がありませんでしたが、近年のゲノム技術の進展によりマイクロアレイ法やDNAチップなどのトランスクリプトーム・スキャニングが登場し、遺伝子機能解析の最有力の技術となることが期待されています。一方、従来から疾患病態解析や薬効評価に用いられてきた疾患動物モデルに関する膨大な生理、生化学薬理データと大量の網羅的な遺伝子変動との相関を生物情報学的に解析することにより、病態・治療に関連する遺伝子の抽出、同定が可能となると考えられます。本研究により病態ゲノム解析に基づく新たな創薬戦略の展開が期待されます。

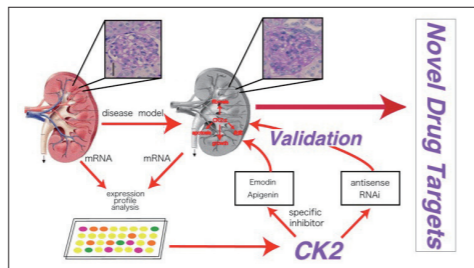


ラット腎臓切片におけるPAS染色(腎組織病像)

2 研究プロジェクトの目標

副作用の無い腎炎治療を目指して

本研究の主任研究者は以前、動物病態モデルの発現プロファイル解析に基づく多因子疾患の病態・治療関連遺伝子解析の手法を腎炎の創薬、新規治療法開発に応用し、腎炎治療標的分子である蛋白質リン酸化酵素CK2(カゼインキナーゼ2)を見だしていました。CK2は腎炎発症時に腎臓(特に糸球体)で著しくその発現量が増大し、その発現の増加は糸球体傷害に密接に関連しています。腎炎モデルラットは天然由来のCK2阻害薬の投与により著明に腎機能、腎臓障害が改善を示したことから、CK2は腎炎の病態、治療標的として重要な分子であると考えられました。しかし、既存の天然由来のCK2阻害剤はいずれも動物実験において腎炎を抑制する一方、CK2活性阻害に共通すると考えられる副作用発現(精巣アポトーシス反応増強)が観察されています。医薬品としての更なる開発はその副作用を回避することがまず優先されます。そのため、構造生物学、分子設計、化学合成、生物活性評価、DDSなどの開発に必要な要素項目の専門家集団により、CK2の病態に於ける機能解析と副作用の無いCK2特異的低分子化合物の創製を目的とした研究を行いました。本研究により、CK2を標的とした新たな治療薬の開発を行い、腎炎の有効な治療法を確立することが期待されます。

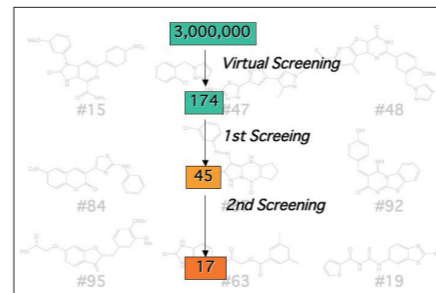


ヒト糸球体腎炎モデル動物のDNAチップ解析による新たな腎炎治療候補分子CK2の同定

3 研究プロジェクトの成果

CK2阻害による腎炎治療、精巣毒性発現機構

CK2阻害剤の評価を目的として、数種類の腎炎モデル動物の比較検討と腎炎進行に伴う腎機能、組織病理学的検索を行う実験系の構築を行い、in vivoの腎炎治療薬評価系を確立しました。また、CK2活性サブユニットにはα、α'二種のアイソザイムが存在し、腎糸球体ではα型が、また精巣での精子形成における毒性発現にはα'型が関与していることを明らかにしました。HTS評価(in vitro並びにin vivo)実験系を用いて後述するin silico分子設計・スクリーニングの結果抽出されたCK2活性阻害候補化合物群の選択・評価を行っています。更に構造最適化を目指して合成された化合物の評価も進めています。

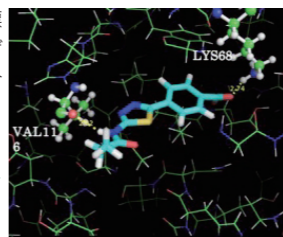


in silico screeningからの新規CK2阻害化合物の創出

in silico 分子設計に関する研究

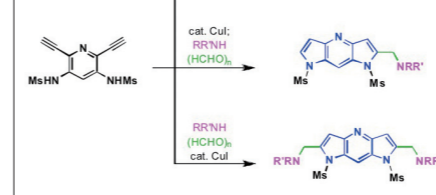
これまで見出したCK2阻害剤はいずれも2種のアイソザイムに非選択的であり、腎炎においてはαアイソザイム選択的阻害剤によって精巣毒性を回避できる可能性が高いと考えられたため、アイソザイム特異的新規CK2標的阻害剤の探索を行いました。各アイソザイムタンパク質のX線結晶構造情報を収集し、各アイソザイムに対する阻害剤の結合様式を詳細に解析しました。この構造生物情報を元に、各種計算化学的手法を適用し、ATP結合部位を標的としたCK2α選択的阻害剤のデザインを行ない、選択性に差のある化合物を創出しつつあります。

▶活性化合物#128の推定結合様式: #128と塩橋および水素結合(黄色破線で表示、数字は原子間距離)を形成するCK2αのLYS68とVAL116



CK2阻害剤創薬テンプレートの構築

本研究により得られたCK2阻害剤に関する構造活性相関および共結晶X線解析情報に基づき、ジピロロ[3,2-b:2',3'-e]ピリジン(DPP)を中心骨格とする創薬テンプレートをデザインしました。DPP骨格の合成例はこれまで報告されていないため、新規性の高いCK2阻害剤の創出が期待できます。本テンプレート構築法の検討を行った結果、多成分カップリング-二環同時構築反応によるDPP誘導体の効率的合成に成功しました。本反応は様々な官能基を導入した数多くの誘導体を、共通の化合物から一工程で合成できるため、CK2阻害剤の精密かつ効率的な構造最適化研究を行うことが可能となります。



◀多成分カップリング-二環同時構築反応によるジピロロ[3,2-b:2',3'-e]ピリジン(青色で表示)誘導体の合成

参考文献

Yamada M, Katsuma S, Adachi T, Hirasawa A, Shiojima S, Kadowaki T, Okuno Y, Koshimizu TA, Fujii S, Sekiya Y, Miyamoto Y, Tamura M, Yumura W, Nihei H, Kobayashi M, Tsujimoto G. Inhibition of protein kinase CK2 prevents the progression of glomerulonephritis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.

Suzuki Y, Cluzeau J, Hara T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Oishi S, Ohno H, Fujii N. Structure-activity relationships of pyrazine-based CK2 inhibitors: synthesis and evaluation of 2,6-disubstituted pyrazines and 4,6-disubstituted pyrimidines. Arch Pharm (Weinheim). 341(9):554-61.

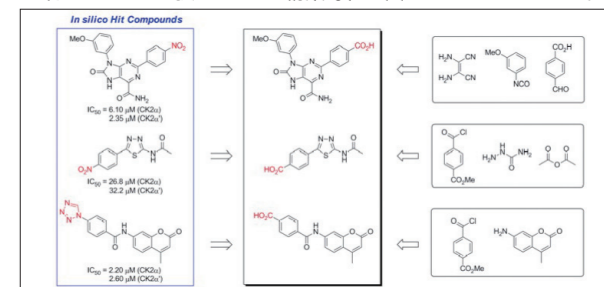
Nakanishi T, Kinoshita T, Sekiguchi Y, Tada T, Nakanishi I, Kitaara K, Suzuki Y, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G. Structure of human protein kinase CK2alpha2 with a potent indazole-derivative inhibitor. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 65(Pt 2):75-9,2009

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

アイソザイム特異的化合物の分子設計と合成

精巣毒性の回避を目的として、これまで、2種のアイソザイムの構造生物情報に基づきin silicoで低分子化合物の分子設計、ドッキング実験、フォーカスライブラリー合成、HTS活性評価系によるスクリーニングを行い、候補化合物の選択を行ってきました。立体構造解析から分子設計、活性評価へ至る全ての段階の実験系が確立されており、今後in silicoスクリーニングから選ばれた新規化合物探索システムを用いて、新規特許性の高いCK2阻害剤の創出が期待されます。

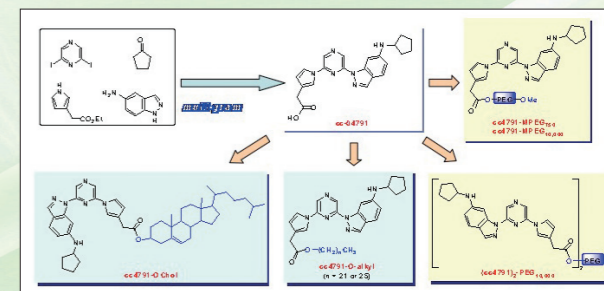
しかしその一方で、CK2αとCK2α'は活性部位の2アミノ酸しか異なっていないため、α型選択的阻害剤をデザインに困難も予想されています。そのため、α型選択的阻害剤以外の方法の検討も行いました。現在最も強力である高活性CK2阻害剤は極めて脂溶性に富んでおり、その化学特性により副作用が発現した可能性があることから、PEG修飾などで親水性を高めたものを作成、検討しています。これは腎臓で速やかにエステラーゼにより親化合物へと変換しますが、精巣ではその変換が最小のものを選択することで精巣毒性を回避しようとしています。



in silicoグループとの連携によるCK2阻害剤候補化合物の合成

低分子化合物の至適DDS開発

新規化合物の分子設計と並行して、CK2阻害剤の臓器分布特性を制御できるデリバリーシステムの開発を行っています。低分子化合物のデリバリーシステムとしては、リポソーム、エマルジョン等の脂質分散系製剤を用いた剤形修飾のアプローチを試みました。各種リポソームを作成し、その組織送達度を検討し、腎臓と精巣への送達比が大きく異なる方法を見出すことに成功しています。そのカチオン性リポソームを用い、コレステロール修飾した高活性CK2阻害剤を封入し、投与する方法を確立しつつあります。このDDSを用いることにより腎炎治療効果が期待でき且つ精巣毒性を回避することが可能と考えられます。現在、精巣毒性を回避するDDSの基礎検討が終わり、実際に腎炎動物モデルで実証を行い最終的な候補製剤を絞り込む予定です。また、図に示すように製剤化を目的としたプロドラッグの合成も進めています。以上のように、低分子化合物の腎炎動物モデルラットにおける有効性・安全性などを指標に効果の比較・検討を行い、CK2を特異的に阻害する低分子化合物の腎臓選択的デリバリーシステムの確立を目指しています。



既知CK2阻害剤のリポソーム製剤化を目的とした脂溶性エステル型プロドラッグの合成