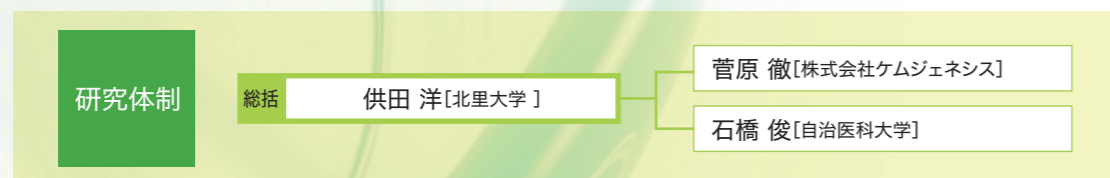


コレステロールアシル転移酵素アイソザイム ACAT2 選択的阻害剤の開発

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)



※平成21年度における研究体制

新しい動脈硬化症予防治療薬開発への挑戦

Project KeyWord

動脈硬化症 → 日本人の死因の第二位と第三位である心疾患と脳血管疾患の主な原因が動脈硬化症です。スタチン系と呼ばれる医薬品が使用されていますが、30%程の患者にしかならないことから、新しい予防治療薬が求められています。

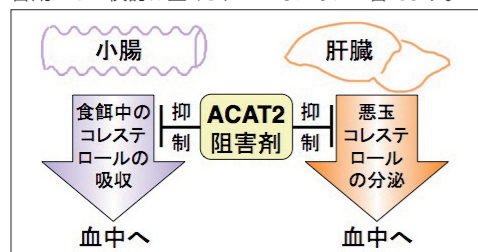
コレステロールアシル転移酵素2 → コレステロールと脂肪酸から中性脂質(コレステリルエステル)を生成する酵素で、ACAT2と略します。小腸では食餌由来のコレステロールの吸収に、肝臓では低密度リポタンパク質(悪玉コレステロールの一種)などの分泌に関与します。

ピリピロペンA → 我々がカビ(真菌)の培養液から発見した化合物(PPAと略)で、世界で唯一のACAT2選択的阻害剤と考えられます。ACAT2と動脈硬化との関連をPPAを用いて立証し、さらにPPAをリードとして誘導体の医薬品への発展をめざします。

1 研究の背景・意義

古くて新しい薬剤標的ACAT

今日、動脈硬化症の予防治療薬は、生体内でのコレステロール合成の律速酵素(HMG-CoA還元酵素)を特異的に阻害するスタチン系医薬品が主流です。しかし、約30%の患者さんにしか効果が得られない等の問題があり、新しい医薬品の開発が求められています。本プロジェクトでは、新しい薬剤標的として、コレステロールにアシル基を導入するアシルCoA:コレステロールアシル転移酵素(ACAT)に焦点をあてています。ACATは理想的な薬剤標的として製薬会社を中心に数多くの合成阻害剤が研究されてきましたが、毒性の問題やヒトでの効果への疑問から、ほとんどの製薬会社でその開発は断念された状況にあります。しかし最近になり、ACATには2種類のアイソザイムが存在すること、ACAT1は全身の組織に、ACAT2は小腸と肝臓特異的に発現しその機能が異なっていることがわかってきました。しかし、過去の阻害剤についてはこれらアイソザイムに対する選択性の研究はほとんど行われておらず、調べられたものはACAT1選択的か、ACAT1と2の両方を阻害する薬剤かのいずれかと思われま。最近の遺伝子からの研究成果を考えあわせると、ACAT2は動脈硬化予防治療につながる創薬ターゲットとしての可能性があるもの(図参照)、選択的阻害剤からの検討は全くされていなかったと言えます。

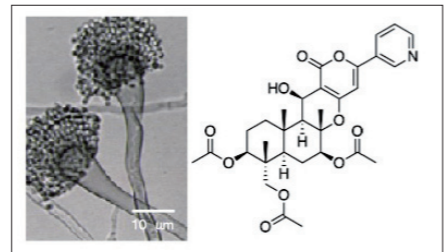


▲ACAT2は、小腸では食餌中のコレステロールの吸収に、肝臓では悪玉コレステロールの分泌に関与すると考えられています。

2 研究プロジェクトの目標

ACAT2を選択的に阻害するピリピロペン

このような背景のもと、我々はまずACAT1と2に対する薬剤の阻害活性を調べる評価系を構築しました。自分たちの有するACAT阻害剤を評価したところ、カビ(真菌)より発見していたピリピロペンA(PPA)がACAT2を選択的に阻害することが明らかとなりました(図参照)。最近の合成ACAT阻害剤の報告を考慮しても、このような特色を示すものは他に見当たりません。既に化学合成していた約300種類のPPA誘導体についても阻害活性を測定したところ、驚いたことに、PPAが最も優れた選択性(ACAT1阻害との差が1000倍以上)を示しました。そこで、本研究の目標として、まず、1)ACAT2選択的阻害剤の有効性は明らかとなっていないことから、動脈硬化症マウスを用いてPPAが動脈硬化抑制効果を示すのかどうかを明らかにする、もし効果が認められた場合は、2)PPAは薬物代謝酵素によって加水分解されると予想される3つのエステル結合をその構造中に有することから、肝臓や血中でのPPAの代謝がどのように進むか明らかにする、さらに、3)得られたPPA代謝を考慮して、薬物代謝酵素によって分解されにくく、なおかつACAT2に対する選択性や阻害活性がPPAよりも優れた誘導体を創製することです。このようなプロセスから、PPAをリードとしたACAT2阻害剤を創製し、



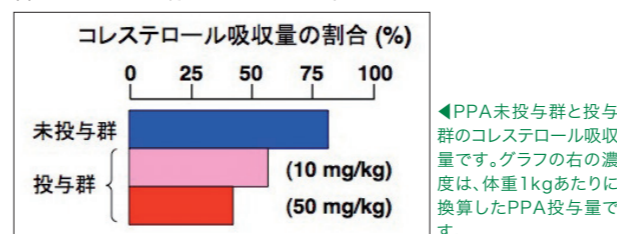
▲ピリピロペンAを生産するカビの電子顕微鏡写真像(左)と構造式(右)です。写真内の白線は1億分の1メートルを表します。

新しい動脈硬化予防治療薬への応用を最終的に目指したいと思います。

3 研究プロジェクトの成果

ピリピロペンAは小腸と肝臓で効果を発揮

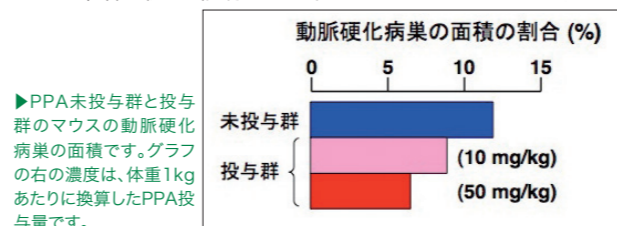
細胞や酵素を用いた実験では理想的な阻害活性を示しても、実際に動物に投与すると全く効果を示さない場合も多くあります。そこで、PPAがマウスレベルでも小腸と肝臓でACAT2を阻害するかを調べました。その結果、図に示したように、PPAを投与したマウスでは小腸からのコレステロール吸収は顕著に抑制され、約半分にまで減少していました。また、血中の悪玉コレステロールを構成する中性脂質の分子種の解析から、PPAは肝臓においても効果を示していることが示唆されました。以上のように、PPAはマウスレベルでもACAT2の機能を阻害していることが明らかとなりました。



◀PPA未投与群と投与群のコレステロール吸収量です。グラフの右の濃度は、体重1kgあたりに換算したPPA投与量です。

ピリピロペンAは動脈硬化症を予防した!

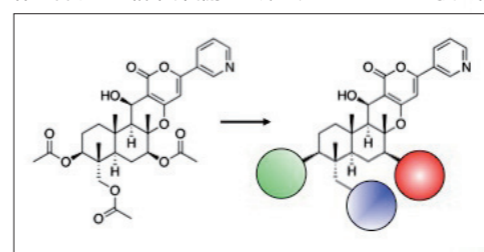
動脈硬化発症マウスを用い、高脂肪食を与えながらPPAを3ヶ月間にわたって毎日経口投与しました。驚いたことに、投与を開始してすぐに血中コレステロール値の減少が観察されました。また、3ヶ月の投与の間、過去の合成剤で問題となったような下痢や肝障害等の副作用は全く認められませんでした。投与後に動脈硬化病巣の面積を定量化したところ、図に示したようにその面積は約半分にまで減少していました。以上のように、ACAT2選択的阻害剤は動脈硬化症の予防治療薬となることを世界で初めて証明しました。



▶PPA未投与群と投与群のマウスの動脈硬化病巣の面積です。グラフの右の濃度は、体重1kgあたりに換算したPPA投与量です。

次世代のピリピロペン誘導体

PPAには、代謝酵素によって分解されてしまう可能性が高いエステル結合が3ヶ所あります。肝ミクロソームを用いて代謝酵素に対する影響を調べたところ、2カ所は加水分解されやすく、1カ所はほとんど代謝されないことが明らかとなりました。そこで、分解されやすい2カ所には代謝酵素に対して安定な置換基を検討し、安定な1カ所にはACAT2選択的阻害活性を高める置換基を探索しました(図参照)。170種類の誘導体を合成した結果、代謝されにくく、かつACAT2選択的阻害活性が優れた



▲ピリピロペンAをスタートとして誘導体を合成しました。丸で示した部分に種々の置換基を導入しました。

た次世代誘導体を見出すことができました。

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

ピリピロペンAより優れた誘導体の選別

次世代誘導体の中から次のステップに進める化合物をどのようにして選別するかは非常に重要なポイントです。我々は、PPAを経口投与した動脈硬化モデルマウスはわずか2週間で血中コレステロール値が減少し、その変動は動脈硬化病巣の進展と相関することを見いだしました。そこでまず、代謝酵素に安定でACAT2に対する選択性と阻害活性を示した化合物を選び、それらをマウスに2週間投与して血中コレステロール量を定期的にモニターしてその変動をチェックすることにより、有望な次世代誘導体を選別しました。その結果、PPAより優れた血中コレステロール低下作用を示す約10種類の誘導体を選別することができました(表参照)。試験管レベルで解析した代謝酵素に対する安定性と細胞レベルで解析したACAT2阻害活性のデータは、マウスにおける血中コレステロール量の低下作用と非常に良く相関していたことから、我々のこの絞り込みの戦略が、とてもよく機能していると判断しています。すでに、いくつかの誘導体はマウスへの投与を開始し3ヶ月間にわたる解析を進めておりますが、動脈硬化抑制効果がPPAよりもはるかに

誘導体	阻害活性の比	ACAT2に対する選択性
1	9.7	> 9,900
2	5.9	> 6,200
3	78	4,600
4	3.0	> 3,000
5	1.9	> 1,900
6	1.7	> 1,700
7	14	1,500
8	11	1,500
...
PPA	1	> 1,000

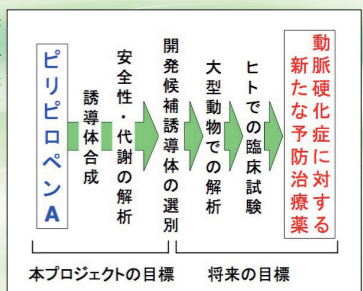
優れていることを示すデータが得られてきており、今後の成果が期待されております。

▲阻害活性の比は、ACAT2阻害活性がPPAより何倍強いかを意味し、選択性はACAT1とACAT2の阻害活性の差です。

医薬品への発展をめざして

PPA及びマウスで効果を示した約10種のPPA誘導体について、今後医薬品として発展させていくためにはまだまだ解決しなければいけない問題があります。1)まずこれら誘導体についてマウスを用いた前臨床試験を行い、安全性を明らかにしていかなければなりません。すでに、PPAおよび一部の誘導体に関して、マウスを用いた急性毒性試験や亜急性毒性試験等について解析を始めておりますが、現在までのところ、致死毒性、肝毒性や腎毒性等の顕著な毒性は認められません。今後は、変異原性試験等のさらに詳細な毒性試験についても解析を進めようと考えております。そして、2)薬物の体内動態についても解析を進める必要があります。肝臓での代謝に関しては、肝ミクロソームを用いた試験管レベルでの解析によって、代謝酵素に対する安定性や生じる代謝産物の構造などが明らかになってきております。今後は、それらのデータを足がかりとし、マウスを用いた生体レベルでの代謝の解析を進め、さらに、吸収、分布、排泄等の体内動態も調べていく予定です。3)将来的には、ウサギやサル等のより高等な動物を用いてその効果を調べていく予定です(図参照)。これらの研究を展開しながら製薬企業との連携も視野に入れ、医薬品へ向けた研究を展開したいと考えております。

▶今後の研究予定。ピリピロペンAをリードとして用いた種々の実験を行い、臨床試験へ進めたいと考えております。



参考文献 Tomoda H., Omura S. Pharmacol. Ther. 115, 375-389 (2007)
 Ohshiro T., Matsuda D., Nagai K., Doi T., Sunazuka T., Takahashi T., Rudel L.L., Omura S., Tomoda H. Chem. Pharm. Bull. 57, 377-381 (2009)
 Ohshiro T., Ohte S., Matsuda D., Ohtawa M., Nagamitsu T., Sunazuka T., Harigaya Y., Rudel L.L., Omura S., Tomoda H. J. Antibiot. 61, 503-508 (2008)