

種目 (探索研究)

HBV 排除化合物の探索

和漢薬エキスをライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングと活性成分の分析

申請代表者	松島 綱治	東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門	教授
所外共同研究者	本多 政夫	金沢大学 大学院医薬保健学総合研究科病態検査学講座	教授
所外共同研究者	上羽 悟史	東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門	准教授
所外共同研究者	Chandrasekar Balachandran	東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門	助教
所外共同研究者	横地 祥司	東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門	客員研究員

■背景・目的

東京理科大学生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門では、DOCK11(GEF)とその主要な会合分子である Cdc42(Rho GTPase)との分子間相互作用が、HBV DNA の複製に不可欠な役割を担うという共同研究者、橋本らの知見に基づき阻害化合物の探索を実施している。本研究では、和漢薬エキスをライブラリーから、これらの分子間相互作用を阻害する低分子化合物を多段階スクリーニングにより探索し、最終的に細胞レベルでの検証および最適化試験を行い、HBV 排除化合物を同定することを目的とした。

■結果・考察

DOCK11 と Cdc42 組み換えタンパクを動物細胞にて発現させ、Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) 技術により細胞内での相互作用 (PPI) をハイスループットスクリーニング (HTS) で検出できるアッセイ系を構築した。

NanoBRET スクリーニング系、および、HBV エントリー/cccDNA モニタリング系に、和漢薬エキスをライブラリー、化合物ライブラリーをかけて、ヒットエキス・化合物を見つけた。

その結果、DOCK11 と Cdc42 の特異的相互作用を阻害する 3 つの化合物 (Honokiol, Shikonin, [6]-Shogaol) を見出した。

No	生薬名	試験名	NanoBRET assay				WST-8 (24 h)
		濃度	Dock9		Dock11		
	単位	50 μM	IC50 (μM)	50 μM	IC50 (μM)		
60	Honokiol	Active	36	Active	32	24.6	
91	Shikonin	Active	3.2	Active	8.5	4.7	
92	[6]-Shogaol	Active	42	Active	43	26.1	

しかしながら、いずれも、WST8 を用いた細胞毒性試験において、有効濃度と近い濃度での細胞毒性が検出されたため、そのままでは、医薬品としての開発は難しいものと考えられた。

ただ、これらの化合物は、ユニークな構造を持つ生理活性物質であることから、今後、これらの化合物の誘導体を合成して、細胞毒性のない有効化合物を開発していくことが期待できる。

■結論

和漢薬エキブライブラリーおよび化合物ライブラリーについて、DOCK11 と Cdc42 の細胞内蛋白質相互作用（PPI）の NanoBRET スクリーニングシステムを用いて阻害作用を評価した。その結果、特異的阻害作用を有する3つの化合物を見出した。

いずれも、薬効濃度に近い濃度での細胞毒性が検出されたため、そのままでは、医薬品としての開発は難しいものと考えられたが、ユニークな構造を持つ生理活性物質であることから、今後、これらの化合物の誘導体開発が期待できた。