

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18904

研究課題名（和文）上皮成長因子受容体変異体vIII発現細胞の分子標的薬リード創製と作用機序解明

研究課題名（英文）Development and action mechanism elucidation of molecular targeted drug for epidermal growth factor receptor vIII overexpressing cells

研究代表者

木村 智之（KIMURA, Tomoyuki）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40462270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：Ertredinは、NIH3T3細胞を用いた足場非依存的細胞増殖阻害物質の探索研究により見出された化合物であり、その活性、物性にはまだ改善の余地があり、作用機序の解明も求められていた。そこで、本研究課題を考案した。活性発現に重要な役割を担っている部位を各官能基に注目して構造活性相関研究を展開することで明らかにした。評価系にヒト肺基底上皮腺がん細胞A549を加え、多角的に化合物を評価することによりErtredinより強い活性を示す化合物を見出すことができた。本化合物はミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに対し作用し、その下流のSTAT3リン酸化抑制を誘導することで活性発現していると推察される。

研究成果の概要（英文）：Ertredin is a compound found by searching for anchorage-independent cell proliferation inhibitor using NIH 3T3 cells. There was still room for improvement in the activity and physical properties of Ertredin. Therefore, I focused on this research project. By the structure-activity relationship study of Ertredin, I revealed the functional group which plays an important role in activity expression. From those results, I found new compounds having stronger activity than Ertredin. It also was showed activity in the new evaluation system to which human alveolar basal epithelial adenocarcinoma cell A549 was added. Also, these compounds acted on the mitochondrial respiratory chain complex I.

研究分野：有機合成化学

キーワード：分子標的 構造活性相関研究 作用機序解明

1. 研究開始当初の背景

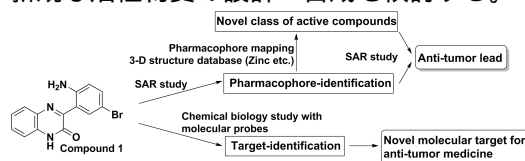
上皮成長因子受容体 (EGFR) は上皮成長因子 (EGF) 等のリガンドの結合への応答として二量化細胞膜内領域の自己リン酸化亢進増殖シグナル伝達、という一連のフローで細胞の増殖等を制御する受容体型チロシンキナーゼである。この EGFR はがん組織において頻繁に変異・増幅が見られ、その悪性化に関与することが知られている。中でも極めて悪性な脳腫瘍の一つである神経膠芽腫では、患者の6割程度のがん組織のゲノムにおいて EGFR 遺伝子の変化が見られ、更にその半数では、エクソン2からエクソン7を失い、リガンド結合部位を欠いた変異体である EGFRvIII が過剰発現している。この EGFRvIII はリガンド非存在下でも恒常的な細胞内領域のリン酸化が見られ、増殖シグナルを常におンの状態とすることで高悪性度の主要な原因となっている。EGFR の異常が関係するがんに対しては一連の EGFR キナーゼの阻害物質、すなわち AG1478、ゲフィチニブ、エルロチニブなどが既に分子治療標的薬として開発され、実際に臨床上的治療成績向上にも大いに貢献している。しかしながら、これらの既存医薬も神経膠芽腫に対する効果は不十分であり、新規なリード創製が必須である。申請者所属研究機関の渥美は EGFRvIII を強制発現した NIH3T3 細胞の足場依存性増殖阻害を指標としたスクリーニング系を開発し、本受容体を発現するがん細胞に有効な化合物を探索した。ヒットとして Ertredin を見出した。その際、本化合物が当該細胞の EGFRvIII のリン酸化抑制には関与せず、キナーゼ阻害剤等の既存分子標的薬とは異なる作用機序でその増殖を抑制することが明らかとなった。EGFRvIII の活性化におけるリガンドの非要求性に関する分子生物学的基盤は不明点も多く基礎レベルで興味深い研究対象であり、Ertredin の分子プローブ化等ケミカルバイオロジー研究を通じ標的タンパクを探索しその一端を解明することで、分野をリードしうる立場にある。

2. 研究の目的

上皮成長因子受容体変異体 vIII (EGFRvIII) 発現細胞における足場非依存的増殖を阻害する低分子有機化合物 Ertredin に関し、新たながん分子標的薬リード創製と作用機序解明を目的とした構造活性相関 (SAR) 研究を行う。EGFRvIII は脳腫瘍の一種であり有効な治療法のない神経膠芽腫で多く発現が見られ、リガンド非存在下での恒常的な活性化が見られるが、その分子基盤の多くは未解明である。Ertredin の作用機序として、キナーゼ阻害は否定されており、本研究で見出される標的蛋白は全く新しい抗がん剤分子標的候補となる。合成される化合物群から有望な神経膠芽腫治療薬のリード候補が見出される可能性もあり、創薬基盤研究を通じた難治がん克服への貢献を目指す。

3. 研究の方法

本研究では化合物 Ertredin について当初は2方向の SAR 展開を計画した。すなわち(1) リード創製を目指した活性、および水溶性等の物性の改善、および(2)作用機序解明を目的としたプローブ化、である。まずは Ertredin の部分構造の要否について調べファーマコフォアを確定すると共に、許容される構造修飾の位置・種類に関する情報を収集する。(1) については網羅的 SAR による活性および物性の改善、ならびに2次評価としての in vivo 治療実験を軸とし、(2)についてはバイオチン、光反応性置換基による修飾やビーズ等の担体上への保持を基に、ケミカルバイオロジー的手法を用いた被験細胞由来の結合蛋白の同定を目指す。後者からは神経膠芽腫に有効な抗がん剤の全く新しい分子標的を提示される可能性がある。ファーマコフォアを確定し、更に導入することで好ましい効果を示す置換基等の種類・箇所が明らかになれば、計算化学も利用しながら骨格変換等を含めた新規な活性物質の設計・合成も検討する。



4. 研究成果

はじめに生物活性発現に必須となる各官能基 (部分構造) を探った。その結果、活性発現に重要な役割を担っているのは、アミノ基、ブロム基であることを明らかになった。次に、アミノ基およびキノキサリン環のNH 上にアルキル基ならびにアシル基等を導入し、当該箇所を足場とした各種誘導体展開が可能であるか確認を行った。アミノ基はアシル基を導入しても活性を保持しているが、キノキサリン環のNHにアルキル基を導入すると活性が消失することが明らかとなった。構造活性相関研究の拡張図るべく、既存置換基の変換だけでなく、置換基のない個所にも水酸基、メトキシ基、トリフルオロメチル基、ハロゲンの導入を行った。しかし、ベンゼン環上に置換基を導入すると、足場依存的増殖活性阻害も示すようになるばかりか、毒性も高くなる傾向が見られた。以上のことより、ベンゼン環上の置換基は活性の選択性に重要な役割を担っていることがわかった。構造活性相関研究が進み、これまでマウス由来のEGFRvIII過剰発現NIH3T3細胞だけで化合物の評価を行ってきたが、より化合物の有用性を高めるために新たな評価系として、ヒト肺基底上皮腺がん細胞A549評価系を立ち上げ二つの評価系を併用して化合物の活性を評価することにした。その結果、Ertredinは、NIH3T3細胞に対して強い活性を示すが、A549細胞に対して活性が低下することということが判明した。化合物の合成とその評価を繰り返し行い、その中

からA549細胞評価系においてErtredinを上回る活性を有し、毒性も低い誘導体をいくつか見出すことができた。そこで、これら化合物を用いて、A549細胞を移植したマウスを用いた治療実験を行った。合成した化合物は、毒性が低いので連投も可能であったが、今回の治療実験では、連投は行わず、2週間の試験期間中2回の投与で活性を評価した。その結果、Ertredin誘導体は、投与直後は既存薬と同程度の活性、すなわち腫瘍の増殖抑制を示したが、投与2日後から腫瘍の増大が見られた。既存薬は連投（CDDP 6回投与）することで腫瘍の縮小が確認できたが、Ertredin誘導体は2回投与しても腫瘍の縮小は確認できなかった。患者のQOLを考えると、既存薬より少ない投与回数で、腫瘍縮小あるいは消滅し、毒性がない薬剤開発が求められていると考えているので、より良い薬剤の開発を目指し、知見を深めていく必要がある。

次に、プローブ法を用いた作用機序解明を試みた。活性を保持したプローブを作製するために、ビオチンタグ、光親和性タグなどのタグの検討、またそれらとErtredinの距離を変えるために、アスパラギン酸などのアミノ酸、様々な長さのPEGなどを組み合わせた複数のプローブを合成した。また同時に、東京医科歯科大細谷らにより開発された、ジアドプローブ法の適用も試みた。更に、特異バンドの判定を確かなものにするため、構造活性相関研究で判明した不活性な誘導体を用いて、inactive プローブを合成した。このinactive プローブを用いることにより疑似陽性のバンドを排除することができ特異的に結合したバンドがより明確にわかったからである。しかしながら、それらプローブを用いた実験では、標的タンパク質の同定、作用機序解明には至らなかった。これは、発現量が少ないタンパク質であったか、タンパク質とプローブの親和性が弱く検出できなかったかなどが理由として考えられる。そこで、遺伝子発現（DNA マイクロアレイ使用 クラスタ解析 Connectivity Map 照会）・蛋白リン酸化（二次元電気泳動とリン酸化蛋白染色）の網羅的解析や抗体反応などを利用し、本化合物の作用点を探った。その結果、本化合物は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I であり、その下流のシグナル伝達兼転写因子（STAT3）リン酸化抑制を誘導することが示唆された。EGFR により制御を受けているSTAT3 は、ミトコンドリア機能制御においても重要な役割を担っていることが知られており、Ertredin の標的として妥当であると考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

木村智之、渥美園子、古林良彦、野坂千里、嶋本聖子、川田学、澁谷正史、渡辺匠、柴崎正勝、上皮成長因子受容体変異体 vIII 発現細胞の足場非依存性増殖阻害活性を有する低分子化合物の構造活性相関研究、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017

木村智之、渥美園子、古林良彦、野坂千里、嶋本聖子、川田学、澁谷正史、渡辺匠、柴崎正勝、上皮成長因子受容体変異体 vIII 発現細胞の足場非依存性増殖阻害活性を有する低分子化合物の構造活性相関研究、137 回日本薬学会年会、2017

木村智之、渥美園子、古林良彦、野坂千里、嶋本聖子、川田学、澁谷正史、渡辺匠、柴崎正勝、上皮成長因子受容体変異体 vIII 発現細胞の足場非依存性増殖阻害活性を有する低分子化合物の構造活性相関研究、136 回日本薬学会年会、2016

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
微生物化学研究所
<http://www.bikaken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村智之（KIMURA, Tomoyuki）

公益財団法人微生物科学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40462270

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()