

令和元年6月10日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08327

研究課題名(和文)c-Met キナーゼ Allosteric 部位を主標的とした新規制癌剤の創製

研究課題名(英文)Creation of novel anticancer lead compounds targeting the allosteric site of c-Met kinase

研究代表者

田沼 靖一 (Tanuma, Sei-ichi)

東京理科大学・研究推進機構総合研究院・教授

研究者番号：10142449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌遺伝子産物c-Metキナーゼは、癌発達・進展の全ステップに関与する分子である。私共は、c-Metキナーゼ活性を抑制的に制御するタンパク質分子を見出し、それがc-MetキナーゼのAllosteric部位に結合することを明らかにし、さらに、そのミメティック阻害ペプチド(Vpep)を分子設計した。このVpepの結合配座解析から、Vpepミメティック低分子化合物(Ai：Allosteric inhibitor)への変換設計を、私共が開発したCOSMOS法を用いて行った。興味深いことに、その内の一つのAi1は、既知c-Met Catalytic inhibitors(Ci)の阻害効果を増強した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子標的抗癌治療薬として、これまで腫瘍特異的なKinaseの活性を阻害するものが多く開発されてきた。しかし、そのほとんどはATP結合(Catalytic)部位への結合活性に有しており、他のKinasesへの影響を低減することは困難であった。c-Met Allosteric部位を標的とした本研究は、極めて新規性及び独創性に富んでおり、学術的にも社会的にも重要な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：c-Met kinase, an oncogenic c-Met gene product, is known to be involved in the many steps of cancer growth and development. We have previously found an inhibitory protein against c-Met kinase, and revealed it to bind to the allosteric site of c-Met kinase. Furthermore, the mimetic inhibitory peptide (Vpep) was designed. By the *in silico* analysis of the binding mode of Vpep in c-Met, we could design Vpep mimetic small molecules (Ai：Allosteric inhibitor) by our COSMOS method. Interestingly, among them, Ai1 was found to enhance the inhibitory activities of c-Met catalytic inhibitors (Ci).

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：癌 Met チロシンキナーゼ キナーゼ阻害剤 *in silico*分子設計 ペプチド アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 癌分子標的としてのc-Met Tyrosine Kinaseの妥当性

本研究の分子標的であるc-Metは、レセプター型Tyrosine Kinaseであり、そのリガンドであるHGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor)が結合するとシグナルを経膜的に細胞内に伝達する。このHGF/SF-c-Met系は、腫瘍の増殖、原発巣からの遊走、浸潤、転移、定着、転移巣での血管新生など、癌の発育進展に重要な全てのステップに関与するマスター的なシグナル伝達系であり、その全貌解明は癌の生物学的理解に重要な位置を占める(Birchmeier, et al. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003)。また、多くの癌種において、腫瘍細胞のc-Met発現が悪性度や予後不良と相関関係にあることが示されている。よって、c-Metは新たな癌治療法及び制癌剤開発の極めて重要な標的分子であると考えられる。

c-Met を標的とした治療法として、c-Met の二量体化を阻害する dominant negative Met・Decoy Met の有用性 (Zhang, et al. *Cancer Cell* 2004)や、Met RNAi による c-Met 発現抑制法がリガンド非依存性の腫瘍に対しても著効を示すという報告がある。一方、これらの治療法とともに、c-Met 分子標的治療薬が Met 発現腫瘍に及ぼす影響についても検討されている。human-HGF/SF 過剰発現トランスジェニックマウスを用いた研究では、高 HGF/SF 環境は悪性度の強い肝細胞癌を早期に発癌させ、B 型肝炎ウイルスの HBs 抗原トランスジェニックマウスにおける発癌も早めることが示されている(Xie, et al. *Genes & Cancer* 2013)。さらに、このような肝細胞癌では HGF/SF 遺伝子部分の染色体複製が起きており、autocrine 的に腫瘍増殖を促進させていることが推察される。このような癌は悪性度が高く、未治療のマウスモデルでは致命的な予後不良をもたらすが、面白いことに c-Met 分子標的治療には高い感受性を示す。したがって、より有効な c-Met 標的治療を開発することの重要性は高いといえる。

### In silico創薬手法と結晶構造解析との組み合わせによる新規抗癌治療薬創製の着想

癌治療における低分子阻害薬の探索では、これまで試行錯誤的に膨大な化合物ライブラリーからHigh Throughput Screening系を用いて実験的に選定する方法がとられてきた。そのため、選定段階が非効率的であるばかりでなく、阻害低分子化合物の最適化の点でも問題が生じる。申請者らはこのような課題を克服する新しいコンセプトとして『タンパク質分子の活性/抑制ドメイン(Hot Spot)に対して最適結合ペプチドを *in silico*で分子設計し、その結合立体配座を基に低分子化合物への変換設計を行い、それを自動最適化する』という創薬方法論を立案し、それを実装する新規分子設計手法(COSMOS法：特許第4612270号, US. Patent No.7660677)を開発した。そして、Hot Spotの立体構造をベースとした薬剤開発理論を構築し(Yoshimori, et al. *BMC Pharmacol.* 2007)、いくつかの癌標的分子について、既実践的な実験を行っている(Takasawa, et al. *Bioorg Med Chem* 2010, 2011)。

申請者らはこれまでに、COSMOS 法を用いて c-Met Kinase を標的とした新規 c-Met 低分子阻害薬開発のためのリード化合物の創製研究を進めてきた。その途上で、c-Met の Allosteric 部位に結合し、活性を抑制する新規タンパク質を見出し、その結合領域解析から新規抑制性ペプチド(Vpep)を設計した。さらに、COSMOS 法により Vpep ミメティック低分子化合物(Allosteric Inhibitors;Ai)への変換設計を行った。c-Met の結晶構造から予測されるこれらの Catalytic 部位と Allosteric 部位は近傍に位置していることから、Ai と Ci(Catalytic Inhibitors)とを連結させることにより、1 分子で Dual inhibition 効果を有するこれまでにない特異的 c-Met 阻害剤の創製が可能となると考えた。これらのことから、Ai-Ci 複合体結晶構造解析を基に、新規 c-Met Dual Inhibitor の創製研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

申請者らは、高エネルギー加速研究機構の支援を受け、c-Met-Ai 複合体の X 線結晶構造解析を行った。本研究では、その構造解析情報をもとに、以下の 4 項目の実施によって、新規 Dual Inhibitor の創製を行う。(1) Ai 存在下での既存 c-Met Catalytic Inhibitors (Ci)の阻害効果の変化を詳細に解析する。(2) Ai/Ci Dual 結合様式を X 線結晶解析により決定する。(3) c-Met-Ai/Ci 複合体結晶構造を基に Ai/Ci の最適化及び Tethering 設計により、新規 Dual Inhibitor を創製する。そして、(4) c-Met Kinase 特異的阻害活性、培養癌細胞系による増殖・浸潤抑制及びアポトーシス誘導効果の検証、並びに得られた新規 Dual Inhibitor の生物学的活性を明らかにする。

分子標的抗癌治療薬として、これまで腫瘍特異的な Kinase の活性を阻害するものが多く開発されてきた。しかし、そのほとんどは ATP 結合(Catalytic)部位への結合活性を有しており、他の Kinases への影響を低減することは困難であった。そのため、これらの薬剤には種々の思わぬ臨床的副作用が生じてきた。本研究においてデザインしようとしている薬剤の独創的な点は、1) c-Met Kinase の Allosteric 部位に結合活性を有する阻害剤 (Ai)を見出しており、これまでにない Allosteric 効果をもつ低分子 Kinase 阻害剤の開発が期待できる；2) Catalytic 部位に結合活性を持つ Kinase Inhibitor (Ci)と Allosteric 効果をもつ低分子化合物(Ai)を連結させることで、特異性の向上と Dual inhibition 効果を持つ新規薬剤の創製というこれまでにない独創的な創薬戦略を検証できる、という 2 点である。本研究の主眼は、**c-Met Allosteric 部位を主標的とした新規制癌剤リード化合物の創製**であり、極めて独創性に富んだ研究として、学術的にも社会的にも重要な意義を持つと考えられる。

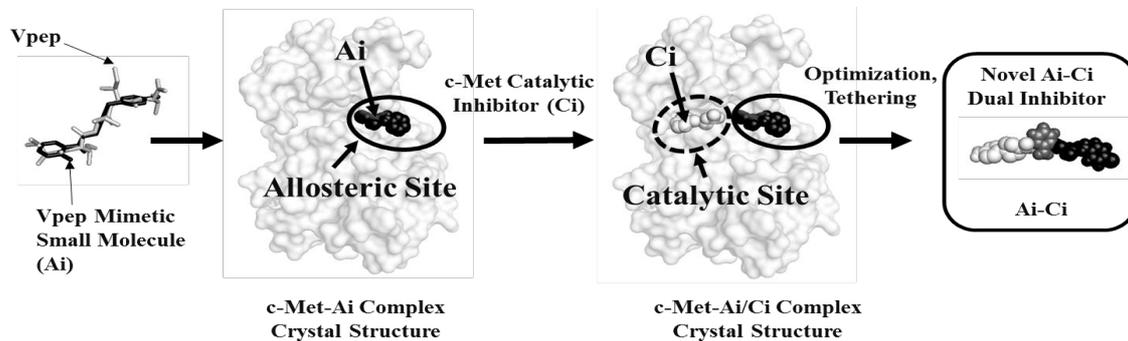


図 1. 新規 c-Met 分子標的制癌剤リード化合物の *in silico* 創製 (概略図)

### 3. 研究の方法

#### Dual inhibition 効果を持つ c-Met 特異的分子標的薬創製の創薬戦略

本研究では、c-Met-Ai/Ci 複合体 X 線結晶構造解析データを基に、新規 Dual Inhibitor を創製することを主目的とし、c-Met を分子標的とした新たな癌治療戦略を提供することを目指す。具体的には、以下の研究項目を順次実施する。

(1) Ai 存在下での既存 c-Met Catalytic Inhibitors (Ci) の阻害効果の変化の詳細な解析、(2) X 線結晶解析による Ai/Ci Dual 結合様式の決定、(3) Ai/Ci-c-Met 複合体結晶構造を基にした Ai/Ci の最適化、及び(4) Tethering 設計による新規 Dual Inhibitor の創製、の順に実験を実施する。そして、得られた候補薬剤について、(5) 生物学的活性の評価(c-Met Kinase 阻害効果の確認、培養癌細胞系による増殖・浸潤抑制及びアポトーシス誘導効果の検証)を行い、(6) 薬剤設計にフィードバックをかけて、さらなる最適化を実施する。7) 最も高い Kinase 阻害効果を示す Dual Inhibitor について、抗腫瘍効果の確認を行い、*in vivo* における有効性について評価する。

まず、COSMOS 法を用いた *in silico* による薬剤デザインとして、Dual inhibition 効果を持つ新規 c-Met 阻害薬の開発スキーム (図 1) に従って、(1)~(4) までの実験を行い新規 Dual Inhibitor のリード化合物を創製する。

#### (1) Ai 存在下での既存 c-Met Catalytic Inhibitors (Ci) の阻害効果の変化の詳細な解析

c-Met-Ai 複合体結晶構造を用いて、基質 ATP 結合部位 (Catalytic 部位) に対して、これまでに報告がある種々の c-Met キナーゼ阻害剤 (Ci) 及び、Virtual screening を実施することによって新たな Ci 候補化合物を得る。これらの化合物の c-Met 阻害活性について、Ai 存在下での変化を詳細に解析する。

#### (2) X 線結晶解析による Ai/Ci Dual 結合様式の決定

(1) の詳細な *in vitro* c-Met Kinase 阻害実験解析と、その阻害剤と c-Met Allosteric 及び Catalytic 部位への結合様式を基に、Ai と Ci を選定する。この Ai/Ci Dual 結合様式を、高エネルギー加速研究機構の支援の下に複合体結晶構造解析により決定する。

#### (3) Ai/Ci-c-Met 複合体結晶構造を基にした Ai/Ci の最適化

(2) で新たに決定された Ai/Ci-c-Met 複合体結晶構造の解析により、Ai 及び Ci 単独での複合体結晶構造とは微細に異なるこれまでにない Ai/Ci 結合配座が得られることになる。この独自の配座を用いて、Ai 及び Ci の最適化設計を行い、それぞれ c-Met Kinase 阻害活性を評価する。

#### (4) Tethering 設計による新規 Dual Inhibitor の創製

(3) で最適化された Ai 及び Ci を用いて Tethering 設計を行う。Ai と Ci が近傍に位置する場合は、2 つの分子を Tethering 手法で連結し、1 剤として特異性と親和性を有する Dual Inhibitor を創製する。Ai と Ci が離れている場合は、2 剤併用 (合剤) における特異性と親和性を評価する (2 drug-combination)。

次に、創製した新規 Dual Inhibitor について生物学的活性を評価する。

#### (5) c-Met Dual Inhibitor の c-Met Kinase 阻害効果、培養癌細胞系による増殖・浸潤抑制及びアポトーシス誘導効果の検証

新規に創製した c-Met Dual inhibitor がどのような阻害効果を持つかについて、Ai と Ci それぞれ単剤における阻害効果を詳細に比較解析する。また、既知の c-Met Kinase 阻害剤との活性比較も行う。さらに、*in vitro* のキナーゼ活性レベルだけでなく実際の腫瘍細胞培養系における抗腫瘍効果について検証する。特に、c-Met に特異的な活性として、MDCK 細胞での scattering や SK-LMS-1 細胞での matrigel invasionなどを指標として、HGF/SF 依存性の c-Met 活性化の状態を、そのリン酸化レベルとともに検証する。また、細胞レベルにおける生物学的変化について、PI3-Kinase/Akt 経路を介したアポトーシスが起きるか否かについても、TUNEL assay や caspase-3 活性化を指標に解析する。

#### (6) Ci の最適化設計

細胞レベルでの腫瘍増殖抑制効果の見られた化合物群の重ね合わせなどの構造活性解析から、どのような母核及び側鎖官能基が c-Met 阻害に対してより効果的なのかについて考察することにより、Ci の最適化設計を行う。

## (7) 新規c-Met Kinase Dual Inhibitorの抗腫瘍効果の検証

細胞レベルでの有効性が確認できた c-Met Dual Inhibitor について、マウス腫瘍移植モデルを用いてその有効性を評価する。静脈内投与時の薬剤の臓器分布、毒性、代謝動態(血中での濃度推移)について確認し、適用量を定めた後、既に申請者らが確立したいくつかの動物モデル(DA3 マウス乳癌皮下移植モデル、B16 黒色腫静脈内注射による肺転移モデル、SKOV3ip 卵巣癌細胞腹腔播種モデル)を用いて抗腫瘍効果の判定を行う。判定に際しては、移植部や転移臓器での増殖能、血管新生、細胞接着分子の発現などに着目した病理解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) c-Met Allosteric Inhibitor(Ai)/Catalytic Inhibitor(Ci)の相乗効果の解析

Vpep は、c-Met の Allosteric 部位に結合するが、それ単独でも弱い阻害効果がみられ、IC<sub>50</sub> は約 30 μM であった(図2, 左)。次に Vpep 単独では阻害効果を現わさない 3 μM を添加した後に、Catalytic Inhibitor(Ci)の PHA の濃度依存的阻害効果を調べた(図2, 右)。興味深いことに、PHA 単独の IC<sub>50</sub> は 2 μM であるのに対して、3 μM Vpep 存在下での IC<sub>50</sub> は 0.7 μM と阻害増強作用が認められた。また、1 μM PHA 単独での c-Met 阻害は 20%程度であるのに対して、3 μM Vpep 存在下では 60%阻害率を示した。さらに、Vpep 存在下では、PHA 単独では阻害効果の見られない濃度 0.03 - 0.3 μM で阻害効果が認められた。以上の結果から、Vpep は Ci に対して相乗効果を発揮することが明らかとなった。

さらに、Vpep ミメティック低分子化合物として、低分子化合物ライブラリー(約 500 万化合物)から Ai1、Ai2 の 2 種類を見出した。

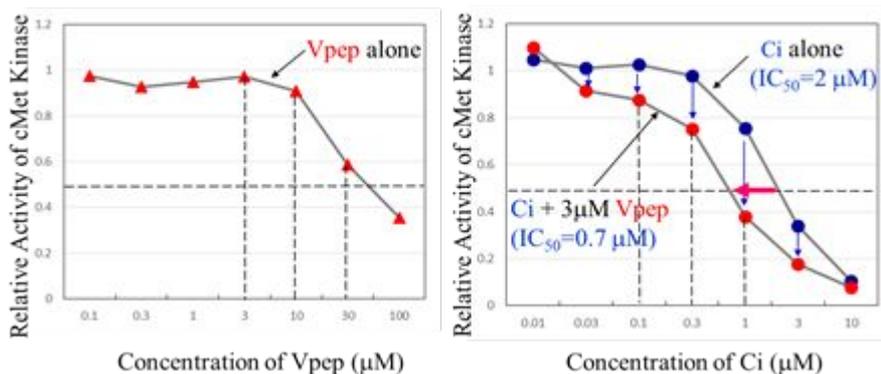


図2. Vpep による Ci の c-Met 阻害剤効果の増強

#### (2) 新規 Catalytic Inhibitors の創製

次に、新規 Ci の創製を目的として、新規母核となる Ci を化合物ライブラリーより *in silico* 創薬手法を用いて探索した(図3, 左)。

その結果、新規 Catalytic Inhibitors として、これまでにない母核として oxindole 骨格を見出し、その誘導体として阻害活性を有する化合物(OX-1)を得た。しかし、まだそれらの阻害活性が PHA に比べて低いことから、現在、最適化を進めていると同時に、更なる新規母核の探索を行った。

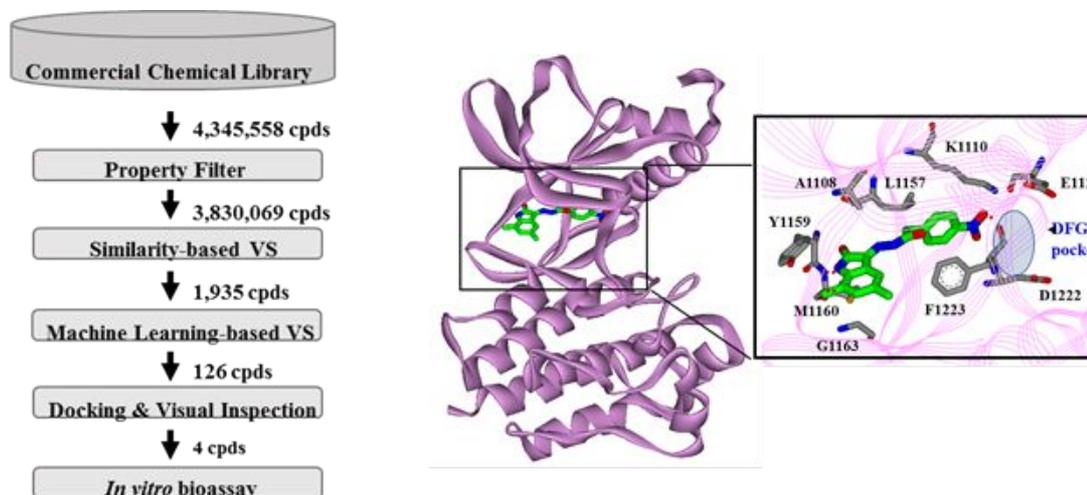


図3. C-Met Ci のスクリーニングと複合体予想構造モデル

### (3) 新規 Catalytic Inhibitors (Ci) の最適化

これまでに c-Met 阻害剤としては報告されていない新たな母核を有する oxindole 化合物 OX-1 を見出した。その誘導体として阻害活性を有する化合物として、OX-02 を得た。OX-01 と OX-02 の阻害効果は、それぞれ IC<sub>50</sub> が約 230 と 50 μ であった。現在、OX-02 のさらなる最適化を行っている。興味深いことに、Ai1 5 μ 存在下での OX-02 の IC<sub>50</sub> は、1.1 μ となり、約 50 倍の増強効果が認められた。

### (4) Ai1/OX-02 複合体予測構造の解析

Allosteric Inhibitor の Ai1 と Ci として OX-02 を用いた時の結合様式を理解するために、その複合体予想構造を *in silico* 解析した (図 3, 右)。この新規 Ci 化合物は、コンピュータシミュレーションによる複合体予測構造モデルから、c-Met の活性中心を形成するアミノ酸残基と特異的な水素結合及び疎水結合を形成することが判明した。また、Ai1 の結合部位と近接していることから、OX-02 と Ai1 を連結することは可能であると推察される。

## 考察

私共は本研究において、c-Met の ATP 結合部位ではなく、Allosteric 部位に結合する新規抑制性ペプチド (Vpep) を、c-Met 抑制性制御タンパク質の相互作用解析から設計し、その変換ミメティック低分子化合物 (Allosteric Inhibitors, Ai) を、COSMOS 法により得た。また、c-Met-Ai 複合体予測構造モデルを構築すると共に、c-Met-Ai/Ci 複合体 X 線結晶構造解析を行い、新規 Dual Inhibitor を創製することを目的とし、c-Met を分子標的とした新たな癌治療戦略を提供することを目指してきた。

特に、(1) Vpep 存在下での既存 c-Met Catalytic Inhibitors (Ci) の阻害効果の変化の詳細な解析、(2) 新規 Ai 及び Ci 化合物の探索・創製、(3) c-Met-Ai/Ci-複合体予測構造を基にした Ai/Ci の最適化、及び (4) Tethering 設計による新規 Dual Inhibitor の創製、の順に実験を実施してきた。その結果、新規母核をもつ Ci 化合物として OX-02 を見出した。OX-02 の c-Met に対する IC<sub>50</sub> は、単独では 50 μ ではあるが、5 μ Ai1 存在下では 1.1 μ となり、約 50 倍阻害効果が増強されることが判明した。また、その複合体予測構造モデルを用いた解析は、Ai1 の Allosteric 部位結合に伴う c-Met のコンフォメーション変化が、OX-02 の阻害効果を相乗的に増強することを示唆している。このことから、Ai と Ci による相乗効果による c-Met を標的とした特異性の高い Dual Inhibitor の創製が期待される。このような Allosteric 効果を有する化合物は、これまでに報告はなく、極めて独創性に富んだ研究成果と言える。現在、c-Met-Ai/Ci Dual 結合様式を、高エネルギー加速研究機構の支援の基に複合体 X 線結晶構造解析を行い、Ai と Ci との Tethering による Dual Inhibitor 創薬へと研究を進めていく予定である。そして、新規 Dual Inhibitor による c-Met を分子標的とした新たな癌治療戦略の確立に貢献したいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

- Tamada K, Nakajima S, Ogawa N, Inada M, Shibasaki H, Sato A, Takasawa R, Yoshimori A, Suzuki Y, Watanabe N, Oyama T, Abe H, Inoue S, Abe T, Yokomizo T, Tanuma S. Papaverine identified as an inhibitor of high mobility group box 1/receptor for advanced glycation end-products interaction suppresses high mobility group box 1-mediated inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 511(3), 2019, 665-670. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.136.
- Ogino Y, Sato A, Uchiyama F, Tanuma S. Genomic and tumor biological aspects of the anticancer nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor FK866 in resistant human colorectal cancer cells. *Genomics*, 査読有, pii: S0888-7543(18), 2018, 30663-3. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.12.012.
- Ogino Y, Sato A, Uchiyama F, Tanuma S. Cross resistance to diverse anticancer nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitors induced by FK866 treatment. *Oncotarget*, 査読有, 9(23), 2018, 16451-16461. doi: 10.18632/oncotarget.24731.
- Shimada N, Takasawa R, Tanuma S. Interdependence of GLO 1 and PKM2 in the *Metabolic shift* to escape apoptosis in GLO 1-dependent cancer cells. *Arch Biochem Biophys*, 査読有, 638, 2018, 1-7. doi: 10.1016/j.abb.2017.12.008.
- Yoshimori A, Tanuma S. Molecular designing of small-molecule inhibitors for apoptosis regulation. *Regulation of Signal Transduction in Human Cell Research* [Curr Hum Cell Res and Appl] (eds. by Shinomiya N, Kataoka H, Xie Q), Springer-Verlag, 査読有, 2017, 199-218. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7296-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7296-3_10)
- Takasawa R, Akahane H, Tanaka H, Shimada N, Yamamoto T, Uchida-Maruki H, Sai M, Yoshimori A, Tanuma S. Piceatannol, a natural *trans*-stilbene compound, inhibits human glyoxalase I. *Bioorg Med Chem Lett*, 査読有, 27(5), 2017, 1169-1174. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.070.
- Tanuma S, Sato A, Oyama T, Yoshimori A, Abe H, Uchiyama F. New insights into the roles of NAD<sup>+</sup>-poly(ADP-ribose) metabolism and poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Curr*

〔学会発表〕(計 56 件)

矢作 有希, 大山 貴央, 渋井 祐登, 阿部 英明, 佐藤 聡, 内海 文彰, 田沼 靖一. PARG 阻害剤の制がん効果を規定する因子の探索 第 41 回日本分子生物学会年会 2018  
稲田 愛, 佐藤 聡, 新藤 実香, 市村 幸一, 内海 文彰, 田沼 靖一 in silico 創薬手法とドラッグリポジショニングを用いた、HMGB1/RAGE 相互作用を標的とする神経膠芽腫の新規制がん戦略 第 77 回日本癌学会学術総会 2018

〔図書〕(計 3 件)

田沼 靖一, 医薬品相互作用研究, NAD<sup>+</sup> - ポリ (ADP-リボース) 代謝を標的とした新規制がん戦略, 42(3), 2018, 9-22.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高澤 涼子

ローマ字氏名：( TAKASAWA,ryoko )

所属研究機関名：東京理科大学

部局名：薬学部薬学科

職名：講師

研究者番号 ( 8 桁 ): 10398828

(2)研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 聡

ローマ字氏名：( SATO , akira )

所属研究機関名：東京理科大学

部局名：薬学部薬学科

職名：講師

研究者番号 ( 8 桁 ): 40530663

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。