

令和元年6月14日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08333

研究課題名(和文) 臨床への応用を目指した活性中心指向型プラスミン阻害剤の設計

研究課題名(英文) Design of the active site-directed plasmin inhibitor oriented to the clinical applications

研究代表者

津田 裕子 (Tsuda, Yuko)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：10098478

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)：プラスミン(Plm)は血管内の血栓を溶解し、血管から除去する。加えて、ガンの浸潤や転移、さらに炎症にも関与していることが次第に分かっており、Plm阻害剤は、ガンや炎症性疾患の治療に使用できる可能性が示唆されている。我々はPlm阻害剤であるY0-2 (IC₅₀ = 0.53 microM) を得ており、今回、Y0-2の構造をもとにして、Y0-2より2.4倍強力に、35倍選択的にPlmを阻害する新規化合物 (IC₅₀ = 0.22 microM) を得た。さらに、Y0-2をマクロファージ活性化症候群(MAS)モデルマウスに投与し、MASによる死亡率を改善できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Plmの血栓以外のタンパク質を分解する活性を制御することを目的として、Plm阻害剤を探索した。Plmの活性化がサイトカインの遊離を誘導し、炎症発症を引き起こす経路を示し、Plm阻害剤をMAS病態マウスに投与して、MASにおける致死率を低下させることを示した。トラネキサム酸(Tra)はリシン結合部位(LBS)に結合することによりPlmを阻害し、安全性が高いため止血薬として現在も臨床現場で汎用されている。著者らが開発した活性中心指向型Plm阻害剤の分子内のTraは、Plmの活性中心に結合しており、単独のTraとは作用点が異なる。新しいPlm阻害剤開発のアプローチといえる。

研究成果の概要(英文)：Plasmin (Plm), a trypsin like protease, is involved in the fibrinolysis pathway. Additionally, the action of Plm at the specific regions of the extracellular milieu lead to the digestion of many proteins at the localized cell surface that results in inducing cell invasion and metastasis and alternating the expression of cytokines. A growing body of data suggests that a Plm inhibitor is a potential candidate as an anti-inflammatory and anti-cancer agent as well as for hemostatics.

In this work, we developed a new Plm inhibitor that has 2.4 fold higher Plm inhibition (IC₅₀ = 0.22 microM) as well as selectivity (Plm/urokinase) by 35-fold, compared with Y0-2 (original Plm inhibitor, IC₅₀ = 0.53 microM). And we presented the efficiency of Plm inhibitor, Y0-2, which reduced tissue damage and improved inflammation-associated lethality in a murine fulminant MAS model.

研究分野：構造活性相関

キーワード：活性中心指向型 炎症性疾患治療薬 プラスミン阻害剤 分子設計

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) プラスミン (Plm) は多機能を有する酵素であることが認識されつつあった: Plm は線溶系において中心的役割を果たしている。しかしながら、Plm により MMPs が活性化され、ガンの組織内浸潤および転移が促進されることや、炎症時に Plm 活性が亢進している事実の積み重ねから、Plm が線溶系以外の病態と深く関わっていることが認識されつつあった。我々もそれを支持する以下の知見 2), 3) を得ていた。

2) Plm 阻害剤は MMP-9 抑制によりガンの増殖を抑制する (*Leukemia*, **2012**, *26*, 332-339): 著者らは東京大学医科学研究所・服部浩一准教授 (当時) らのとの共同研究により、Plm 阻害剤は Plm の抑制を介して MMP-9 を抑制できること、さらにガンの増殖を抑制できることを明らかにした。

3) Plm 阻害剤は MMP-9 の活性化抑制により炎症を軽減する (*Leukemia*, **2015**, *29*, 145-156): 臓器移植後の重篤な副作用の一つである急性 graft-versus-host disease (GVHD) は炎症性疾患である。著者らの研究協力者である服部浩一准教授らは MMP-9 依存的に活性化され炎症を引き起こすサイトカインを、Plm 阻害剤が Plm 阻害を介して抑制する経路を明らかにした。

4) 活性中心(AS)指向型 Plm 阻害剤とリシン結合部位(LBS)指向型 Plm 阻害剤: 止血薬としてトラネキサム酸(Tra)があるが、Tra の止血作用は弱く、大量の投与が必要という問題点を抱えている。加えて、Tra は Plm の活性中心に結合するのではなく、リシン結合部位に結合して、プラスミノゲンから Plm への変換を阻害する。従って、Tra が存在していても、Plm の活性中心は基質を分解することができる。種々タンパク質を分解する「多機能性」Plm の制御のためには、活性中心に直接結合して Plm を制御する AS 指向型 Plm 阻害剤の開発が望まれる。Tra とは異なる点に作用する AS 指向型 Plm 阻害剤は、病態時の Plm の役割を解明し、病態を改善するのに有効なツールとなると考えた。

5) AS 指向型 Plm 阻害剤 YO-2 の特性と Plm への結合様式が明らかにされつつあった: 著者らは Plm に特異的な AS 指向型 Plm 阻害剤 YO-2[trans-4-Aminomethylcyclohexanecarbonyl-L-Tyr(OPicolyl)-NH-Octyl]を報告してきた (*Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1964-1972; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2217-2221; *In vivo*, **2002**, *16*, 281-286)。YO-2 は Plm を特異的に、IC₅₀ 値 0.53 μM で阻害し Tra、L-tyrosine(OPicolyl)、n-octylamine の 3 つの部分から構成されているが、μPlm(Plm の触媒中心を含む領域)との複合体の計算化学によるドッキング研究より、Tra は S1 部位の Asp735 と相互作用していることを明らかとした (*J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2012**, *27*, 571-577)。

2. 研究の目的

Plm は血栓の除去に関わる線溶系において中心的役割を果たす酵素として知られている。しかし、Plm は線溶系のみならず、他の系のタンパク質を分解することにより、様々な病態に深く関わっている多機能性酵素である。著者は本研究において、Plm の「多機能性」に注目し、特に Plm による a)マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の活性化によるガンの組織内浸潤および転移、b)サイトカインの活性化による炎症の発症、といった病態における Plm の役割の解明、ならびに臨床への応用 (病態の改善) を目指して、活性中心指向型 Plm 阻害剤の分子設計ならびに合成研究を実施することを目的とした。

3. 研究の方法

YO-2 の P1, P2 および P1' 残基の置換: 右図に計算化学により求められた、YO-2-μPlm 複合体の相互作用を模式的に示す (*J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2012**, *27*, 571-577)。S1-P1 間にはイオン的な静電的相互作用が、S2-P2 および S'1-P'1 間には疎水的相互作用が働いていることが予測された。

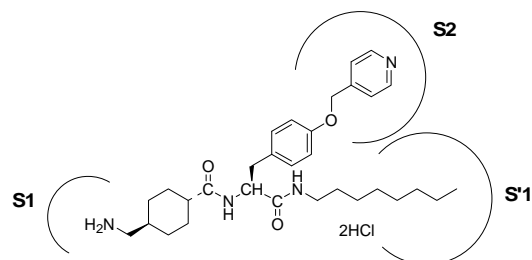


図 . YO-2-μPlm 複合体の相互作用 (計算化学) .

1) P1 残基のデザイン: トロンピン阻害剤のアロガトロバンはじめ、医薬品分子中塩基性基は経口吸収に不利に働き、生物学的利用を低下させる。分子中のアミノ基を回避し、経口吸収を高め高い阻害活性を示した例が Factor Xa 阻害剤で報告されている (*J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5900-5908) ので Tra をチオフェン誘導体で置換することを試みた。

2) P2 残基のデザイン: μPlm と YO-2 の複合体の構造を計算化学的手法により解析し、Plm の S2 site がウロキナーゼなど他のセリン酵素と比較して広く広がっているのに注目した。すなわち、P2 残基 Tyr の水酸基にピコリル基より大きい分子を導入すると Plm は許容できるが、一方ウロキナーゼは許容できないため、結果として Plm に選択的な阻害剤が得られると推測し、

Picolyl 基をキノリン環等に置換した。

3) P1' 残基のデザイン：溶解性を改善するために、Factor XIa 阻害剤で報告されているイミダゾール (*J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 9915-9932)、ベンズイミダゾール等の導入を試みた。他に、オクチル基上でメチル基をスキャンする、等試みた。

4) 病態マウス系における YO-2 の評価：劇症多発性骨髄腫モデルマウス及びマクロファージ活性化症候群(MAS) モデルマウスを作成し、YO-2 による Plm 阻害により、MMP の活性化およびサイトカインの遊離を抑制できるか否か評価した。

4. 研究成果

1) Plm の抑制と多発性骨髄腫及びマクロファージ活性化症候群との関連について、服部教授との共同研究により、以下のことを明らかにした。

a) Plm 阻害は多発性骨髄腫の進展を抑制できないことを示した：Plm は血栓除去に関わっているばかりでなく、多発性骨髄腫患者において凝固線溶系に異常がみられることが報告されており、Plm は腫瘍の形成に関わっている証拠が積み重ねられつつある。しかし、線溶系因子の病態における役割について動物モデルを使用して検討されたことはなかった。今回我々は、劇症多発性骨髄腫モデルマウスを作製し、これに Plm 阻害剤を投与した。Plm 阻害剤は Plm を抑制することはできるが、多発性骨髄腫の進展を抑えることができないことを明らかにした (Salita Eiamboonsert, Yuko Tsuda, Beate Heissig *et. al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *488*, 387-392)。

b) 免疫系の過剰な活性化に凝固線溶系因子が関わっていることを示した：MAS は、免疫の過剰な活性化により引き起こされるサイトカイン・ストームと多臓器で起こる機能障害が特徴であり、生死を左右する重篤な病状である。このような病状では凝固線溶系に異常がみられることは知られているが、線溶系の主要酵素である Plm の役割はわかっておらず、また MAS における Plm の役割について動物モデルを使用して検討されたこともなかった。今回 MAS モデルマウスを作製し、このモデルでは Plm 活性が異常亢進しており、免疫系の過剰な活性化に凝固線溶系因子が関わっていることを示した。さらに、Plm 阻害剤で Plm を抑制すると MAS による死亡率を低下できることを示した (Hiroshi Shimazu, Yuko Tsuda, Koichi Hattori, *et. al*, *blood*, **2017**, *130*, 59-72)。

2) YO-2 より強力に、かつ選択的に Plm を阻害する化合物を得た：Picolyl 基のピリジン環をキノリン環に置換したところ、YO-2 と比較して Plm を 2.4 倍強く阻害し、ウロキナーゼとの選択性が 35 倍改善された (化合物 1, $IC_{50} = 0.22$ and $77 \mu M$ for Plm and urokinase, respectively) (*Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, *24*, 545-553.)。これにより P2 残基の伸長は阻害活性と選択性の向上に有用であることを示した。

3) μ Plm と我々の Plm 阻害剤の共結晶構造を解析し、酵素 - 阻害剤の相互作用様式を明らかにすることができた：我々の Plm 阻害剤と μ Plm - 複合体の結晶構造によれば、Tra は μ Plm の S1 サブサイトと、ピコリルチロシンは S1' および S3' サブサイトと相互作用している。一方、カルボキシ末端のオクチル基は μ Plm の S2' サブサイトと相互作用しておらず、 μ Plm の外側に向かって伸びていることを明らかにした (Ruby H, P. Law, Koushi Hidaka, Yuko Tsuda, *et. al*. *Blood Advances*, **2017**, *1*, 766-711)。
それらの知見を基に 4)、5) に示すように阻害剤の設計と合成を行った。

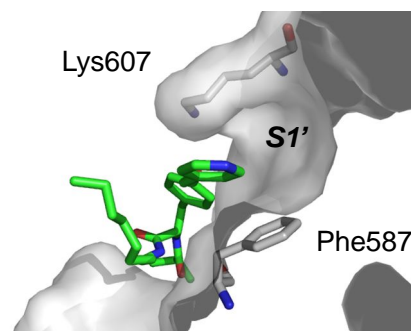


図. S1' サブサイトにおける YO-2- μ Plm 複合体の相互作用 (X 線共結晶構造)。

4) X 線共結晶構造に基づき、S'ポケットとの相互作用を増強する分子設計を行った：

a) 環状 Plm 阻害剤：カルボキシ末端のオクチル基は μ Plm の S2' サブサイトと相互作用しておらず、酵素との結合に寄与していないとされた。そこでこの部分を環状化して S'ポケットとの相互作用を増強することを試みた。チロシンの側鎖ヒドロキシ基とカルボキシ基を伸長し、ring closing metathesis (RCM) またはラクタム形成により 16 員環 ~ 22 員環化合物を合成した。それら化合物の中で、不飽和結合を有する 20 員環化合物がもっとも強力に Plm を阻害した (2 , $IC_{50} = 3.68 \mu M$)。18 及び 20 員環状化合物 (3) は、対応する鎖状化合物の約 5 倍強力に Plm を阻害した。

b) イミダゾール基の導入：近年、イミダゾール基を有する第 XIa 因子阻害剤が報告された。第

XIa 因子は Plm と同様にトリプシン様セリン酵素であるが、作用は異なり血栓形成に関わる酵素である。報告された第 XIa 因子阻害剤は、YO-2 と同じく Tra を有し、さらに Phe 分子を含んでおり、その構造上の類似性から、イミダゾール基を有する Plm 阻害剤の合成を着想した。S' サブサイトにおける相互作用を付加する目的で、オクチル残基の代わりにイミダゾール基(フェニルイミダゾール型、あるいはベンゾイミダゾール型)を導入した。フェニルイミダゾール骨格は FXIa 阻害剤の足場として使用されており、それを参照した。合成した化合物中、フェニルイミダゾール型化合物 5 は最も強く Plm を阻害した ($IC_{50} = 2.17 \mu M$)。それに対して、ベンゾイミダゾール型化合物 6 は弱いながら Plm を阻害し ($IC_{50} = 21.5 \mu M$)、選択性は 5 より優れていた。合成したすべての化合物は、測定溶媒に対してよく溶解し、溶解性の改善には有用であった。

5) S1 ポケットの Asp735 と静電的相互作用をしている Tra 部分の改変:

Plm 阻害剤である YO-2 分子中の Tra の S1 ポケットにおける相互作用を考慮し、a) シクロヘキサン環をベンゼン環へ置換し、b) Tra に替わる残基としてチオフェン誘導体を試み、c) 二環性複素環を導入し、Plm 阻害活性への影響を検討した。これら化合物のうち、P1 残基として Tra の代わりにアミノメチル安息香酸を導入した化合物は、YO-2 には及ばないながら最も強力な Plm 阻害 ($IC_{50} = 0.92 \mu M$) を示した。しかし、アミノ基をもたない各種クロロチオフェンカルボン酸やクロロチオフェンスルホン酸を導入した化合物は、10,000 μM でも Plm を阻害しなかった。二環性複素環構造を有する化合物は、弱いながら Plm を阻害した ($IC_{50} = 27.6 \mu M$)。合成したすべての化合物は測定溶媒に対する溶解性が乏しく、溶解性の改善を可能とする官能基の導入が必須と考えられた。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)

Naoki Teno, Keigo Gohda, Yukoko Yamashita, Tadamune Otsubo, Masafumi Yamaguchi, Keiko Wanaka, Yuko Tsuda: Plasmin inhibitors with hydrophobic amino acid-based linker between hydantoin moiety and benzimidazole scaffold enhance inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 2259-2261. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.03.047. (査読有)

Law RHP, Wu G, Leung EWW, Hidaka K, Quek AJ, Caradoc-Davies TT, Jeevarajah D, Conroy PJ, Kirby NM, Norton RS, Tsuda Y, Whisstock JC: X-ray crystal structure of plasmin with tranexamic acid-derived active site inhibitors. *Blood Adv.*, **2017**, *766-771*. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016004150 (査読有)

Sarita Eiamboonsert, Yousef Salama, Hiroshi Watarai, Douaa Dhahri, Yuko Tsuda, Yoshio Okada, Koichi Hattori, Beate Heissig: The role of plasmin in the pathogenesis of murine multiple myeloma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2017**, *488*, 387-392. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.062. (査読有)

Hiroshi Shimazu, Shinya Munakata, Yoshihiko Tashiro, Youse Salama, Douaa Dhahri, Salita Eiamboonsert, Yasunori Ota, Haruo Onoda, Yuko Tsuda, Yoshio Okada, Hiromitsu Nakauchi, Beate Heissig, Koichi Hattori: Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality in a murine model of macrophage activation syndrome. *Blood*, **2017**, *130*, 59-72. DOI: 10.1182/blood-2016-09-738096. (査読有)

[雑誌論文] (計 4 件)

(学会発表)

Yuko Tsuda, Koushi Hidaka, Yoshio Okada : Exploration of plasmin inhibitors targeting an S2 subsite. The 16th Akabiori conference. 2016 年 5 月 24 日 ~ 25 日、神戸、六甲山ホテル

園田浩士, 榊田昂志, 日高興士, 北條恵子, 合田圭吾, 手納直規, 和中敬子, 津田裕子: S1 ポケットにおける相互作用を利用したプラスミン阻害剤の分子設計. 第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2016 年 8 月 5 日 ~ 6 日, 豊中, 千里ライフサイエンスセンター

Naomichi Iwasa, Takashi Masuda, Mototsugu Kuno, Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Keigo Gohda, Naoki Teno, Keiko Wanaka, Yuko Tsuda: Plasmin specific inhibitors: Optimization of the P2 and P1' residues. 34th European Peptide Symposium, 2016 年 9 月 4 日 ~ 9 日, ライツツィヒ, ドイツ

Takashi Masuda, Mototsugu Kuno, Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Keigo Gohda, Naoki Teno, Keiko Wanaka, Yuko Tsuda: Structure-based design of plasmin inhibitors with novel P1' moiety The 53rd Japanese Peptide Symposium, 26th-28th October 2016, Kyoto

山下ユキコ, 手納直規, 合田圭吾, 大坪忠宗, 山口雅史, 和中敬子, 津田裕子: 疎水性アミノ酸をリンカーとして導入した新規プラスミン阻害剤の合成と構造活性相関の検討. 第 34 回メキシカルケミストリーシンポジウム, 2016 年 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日, つくば国際会議場

園田浩士, 日高興士, 北條恵子, 合田圭吾, 手納直規, 和中敬子, 津田裕子: P1 残基を修飾したプラスミン阻害剤の分子設計. 第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 2017 年 8 月 11 日 ~ 12 日, 豊中, 千里ライフサイエンスセンター

榊田昂志, 久野元嗣, 日高興士, 北條恵子, 合田圭吾, 手納直規, 和中敬子, 津田裕子: X 線構造解析に基づくプラスミン阻害剤の設計. 第 67 回日本薬学会近畿支部大会, 2017 年 10 月 14 日, 神戸, 兵庫医療大学

Seika Sugiura, Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Keigo Gohda, Naoki Teno, Keiko Wanaka, Yuko Tsuda: Design of plasmin inhibitors with targeting the S2' subsite, The 54th Japanese Peptide Symposium, 20th -22nd November 2017, Osaka

杉浦成香, 日高興士, 北條恵子, 合田圭吾, 手納直規, 和中敬子, 津田裕子: S2'サブサイトを標的としたプラスミン阻害剤の設計と活性の検討. 日本薬学会 138 年会, 2018 年 3 月 25 日 ~ 27 日, 金沢

津田裕子, 児嶋基樹, 近藤めぐみ, 日高興士, 北條恵子, 合田圭吾, 手納直規, 和中敬子: S1 ポケットにおける相互作用を標的としたプラスミン阻害剤の分子設計. 第 23 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 2018 年 8 月 3 日 ~ 4 日, 甲府, ベルクラシック甲府

Yuko Tsuda, Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Keigo Gohda, Naoki Teno, Keiko Wanaka: Design of new cyclic plasmin inhibitors. The 35th European Peptide Symposium, 25th -30th September 2018, Dublin

Yuko Tsuda, Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Yoshio Okada: New plasmin inhibitors targeting interactions at the S2' subsite. The 17th Akabori Conference, September 1st -5th, 2018, Konstanz & Lindau

Yuko Tsuda, Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Keigo Gohda, Naoki Teno, Keiko Wanaka: Exploration of Active site-directed plasmin inhibitors. The 10th International Peptide Symposium/The 55th Japanese Peptide Symposium, December 3rd -7th, 2018, Kyoto

川神千昂, 日高興士, 北條恵子, 合田圭吾, 手納直規, 和中敬子, 津田裕子: ベンズイミダゾール骨格を有するプラスミン阻害剤の設計と活性の検討. 日本薬学会 139 年会, 2019 年 3 月 21 日 ~ 23 日, 幕張

後藤光香子, 日高興士, 北條恵子, 合田圭吾, 手納直規, 和中敬子, 津田裕子: 活性中心指向型プラスミン阻害剤のヒト結腸癌細胞(HCT116)への影響. 日本薬学会 139 年会, 2019 年 3 月 21 日 ~ 23 日, 幕張

〔学会発表〕(計 15 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kobegakuin/information/public/teacher/pharmacy>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 日高 興士

ローマ字氏名: HIDAKA, koushi

所属研究機関名: 神戸学院大学

部局名: 薬学部

職名：講師（レクチャラー）
研究者番号（8桁）：30445960

研究分担者氏名：北條 恵子
ローマ字氏名：HOJO, keiko
所属研究機関名：神戸学院大学
部局名：薬学部

職名：助教
研究者番号（8桁）：20289028

(2)研究協力者

研究協力者氏名：手納 直規
ローマ字氏名：TENNO, naoki
所属研究機関名：広島国際大学
部局名：医療栄養学部

職名：教授
研究者番号（8桁）：00535586

研究協力者氏名：合田 圭吾
ローマ字氏名：GOHDA, keigo
所属研究機関名：関西分子設計研究会
職名：主席研究員
研究者番号（8桁）：なし

研究協力者氏名：和中 敬子
ローマ字氏名：WANAKA, keiko
所属研究機関名：血栓止血研究プロジェクト
職名：主席研究員
研究者番号（8桁）：なし

研究協力者氏名：服部 浩一
ローマ字氏名：HATTORI, kouichi
所属研究機関名：順天堂大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：10360116

研究協力者氏名：ロー ルビー
ローマ字氏名：LAW, ruby
所属研究機関名：モナッシュ大学
部局名：Department of Biochemistry and Molecular Biology
職名：講師
研究者番号（8桁）：なし