

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15145

研究課題名(和文) チューブリンを標的とするジケトピペラジン類の創製とケミカルバイオロジー研究

研究課題名(英文) Development of a gamma-tubulin targeting diketopiperazine and its study on chemical biology

研究代表者

林 良雄 (Hayashi, Yoshio)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10322562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、 γ -チューブリンを標的とする新規ジケトピペラジン(DKP)誘導体 "KPU-406" に着目した研究である。がん療法の潜在標的分子である γ -チューブリンの機能解明を目指し、KPU-406の部分構造を有するフラグメント誘導体、及びケミカルプローブとなるビオチン化KPU-406の創製を達成した。今後、得られた誘導体と γ -チューブリンとの相互作用を検討することで、 γ -チューブリンの機能解明や新たな抗がん剤の創製が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study we focus on a novel diketopiperazine (DKP) derivative "KPU-406" targeting γ -tubulin. To elucidate the function of γ -tubulin, a potential target molecule for cancer therapy, we synthesized fragment derivatives having a partial structure of KPU-406 and biotinylated derivative of KPU-406 as a chemical probe. From now on, through determination of the interaction between obtained derivatives and γ -tubulin, it is expected that the function of γ -tubulin is elucidated, leading to the new anticancer drug development.

研究分野：創薬化学

キーワード：ジケトピペラジン γ -チューブリン プリナブリン 抗がん剤 水溶性プロドラック

1. 研究開始当初の背景

γ -チューブリンは、 α/β -チューブリンと類似した蛋白質であるが、中心体に局在し α/β -チューブリンの重合を促進する。 γ -チューブリンは細胞分裂期で活性化し、一部のがん細胞では過剰発現が知られている。従って、 γ -チューブリン阻害剤は、分裂期特異的な低副作用の新規抗がん剤になる可能性が考えられる。しかし、これまで選択的阻害剤は存在せず、阻害剤を用いた機能解明研究は遅れている。

本研究者は、以前より天然由来ジケトピペラジン (DKP) であるフェニラヒスチン (Phenylahistin) に注目し、その化学構造を基に強力な α/β -チューブリン阻害剤の開発やその阻害機構の解明研究を実施してきた。即ち、1) 微小管 (α/β -チューブリン) に作用する天然 DKP “Phenylahistin”の分子機能研究 (H12-14 基盤 C (12672162) および H15-16 基盤 C (15590102)) において、強力なチューブリン重合阻害作用を示す誘導体 Plinabulin (図 1) を創製し、更に 2) 作用機構研究

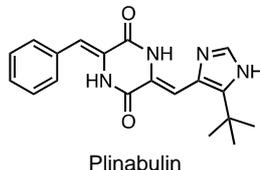


図 1. DKP 型医薬品の開発: 抗がん剤候補化合物 (Phase III)

(H17-19 特定領域 (17035085 及び 18032081))、3) 水溶性プロドラッグ研究 (H17-19 基盤 C

(17590099)、4) 新規 Plinabulin 誘導体の開発研究 (H20-22 基盤 B (10322562)、及び H23-26 基盤 B (233900-29)) により、Plinabulin より約 30 倍殺腫瘍細胞活性が強い誘導体 KPU-133 (ベンゾフェノン含有 DKP) や新規 DKP 骨格を持つ KPU-300 の創製を成し遂げてきた。¹⁻⁴

Plinabulin および KPU-300 は、抗チューブリン作用による殺細胞効果に加え、固形癌のアキレス腱と言われる新生血管への障害作用 (血管遮断作用, VDA) で、がんを兵糧攻めにできる新規抗がん剤と位置づけられ、現在 Plinabulin は Phase III にある。更に新展開として、がん放射線治療の増感剤としての開発研究⁵ (H26 ~ H28 基盤 B: 代表者: 東京医科

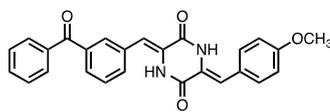


図 2. KPU-406 の構造 α/β -チューブリン及び γ -チューブリンの両者に結合

歯科大 三浦雅彦教授)、水溶性プロドラッグの創製^{6,7}で培われた合成技術から抗体-薬物複合

体医薬の開発研究 (H26-30 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業 (AMED, 代表者: 鹿児島大学伊東祐二教授)) が開始され、本研究者は分担研究者として参画した。⁸

本研究者は、既に 300 種以上の DKP 誘導

体を化学合成し、筑波大学 臼井健郎准教授との共同研究で、中心体で微小管の核形成を促進する γ -チューブリンを阻害する新規 DKP 誘導体 (KPU-406, 図 2) を発見した⁹。本化合物は、従来の α/β -チューブリン阻害剤と同様に抗がん活性を示すと考えられ、今後の γ -チューブリンの機能解明研究や抗がん剤開発への応用が期待される。

2. 研究の目的

上記の背景より本課題は、DKP 骨格を有するチューブリン阻害剤の新たな分子機能研究を実施するものである。殊に発見した KPU-406 の構造を基盤に、 γ -チューブリン機能解明に資する強力度高選択的 DKP 型阻害剤、また α/β -および γ -チューブリンの両者に強力に作用する阻害剤などの創製を行なう。また、これら化合物を修飾して化学プローブを創製し、作用機構解明に挑戦する。

3. 研究の方法

KPU-406 の化学構造を基盤とする誘導体の開発: KPU-406 の周辺構造の探索を行い、より強く γ -チューブリンに作用する化合物の創製をめざす。(図 3) 具体的には、

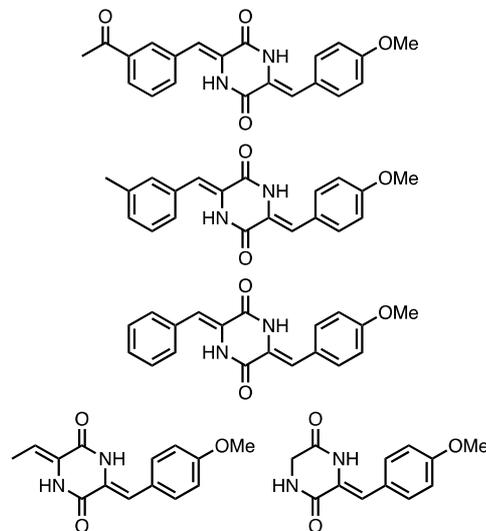


図 3. KPU-406 フラグメント誘導体の構造例

1) 活性に必要な構造的要因の探索として、KPU-406 フラグメントを合成し、結合活性、並びにがん細胞に対する殺細胞活性を評価する。一方、2) KPU-406 には 3 個のベンゼン環があることから、各環に種々の官能基を導入し、 γ -及び α/β -チューブリン双方に対する結合活性並びに殺細胞活性への影響を検討する。

γ -チューブリンに選択的・非選択的な誘導体の開発: 上記の過程で γ -チューブリン選択性の獲得もめざすが、同時に γ -および α/β -チューブリンの両者を強力に作用する誘導体の創製も試みる。即ち、異なる活性/選択性を有する一連の誘導体を得ることで構造活性相関を充実させ、抗がん剤

開発において γ -チューブリンのみの阻害で良いのか、 α/β -チューブリンも一緒に阻害した方が良いのかを検討していく。 γ -チューブリン非選択的阻害剤のリードとしては、先述の KPU-406 に加え、高い殺細胞活性を示したベンゾフェノン型 DKP 誘導体 KPU-300 を選択し、有力な抗がん剤の創製をめざす。(図 4)

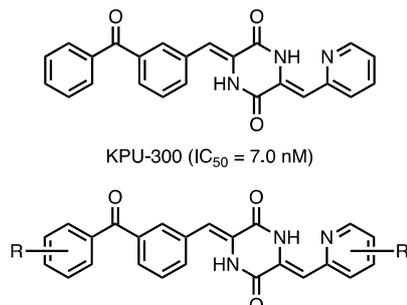


図 4. 高い殺細胞活性を有する KPU-300 とその誘導体

水溶性プロドラッグの創製: KPU-406 及び KPU-300 は難水溶性のため、Plinabulin 水溶性プロドラッグ開発で培った技術に応用し、必要に応じて水溶性プロドラッグ体として合成する。即ち、DKP 環のラクタム構造をラクチム構造へ異性化させ、生じた水酸基に水溶性補助基を架橋した化合物を合成する。

ビオチン化プローブの創製: KPU-406 と γ -チューブリンとの相互作用には、ベンゾフェノン構造よりも *p*-メトキシフェニル構造が大きく寄与していると推測される。そこで、ベンゾフェノン側にリンカーを介してビオチン構造を導入した誘導体を創製する。(図 5) この誘導体を、ビオチン-アビ

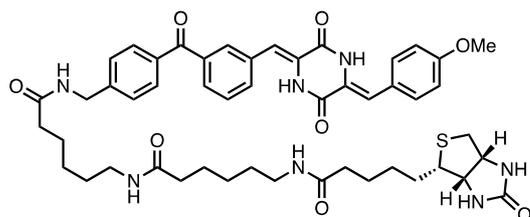


図 5. ビオチン化 KPU-406 の構造

ジンの特異的相互作用を利用したケミカルツールとし、 γ -チューブリンの標識化、結合部位探索や高親和性誘導体の探索を展開する。

なお、合成した各誘導体の γ -および α/β -チューブリンへの結合定数は、誘導体の添加によるチューブリンタンパク質内に存在する Trp 残基に由来する自家蛍光の変化より算出する。尚、DKP 化合物の自家蛍光は本測定に影響しないことを確認している。 γ -チューブリン阻害活性は、GTP 結合阻害試験にて検定する。その他の高次活性評価については、協力研究者の筑波大学白井健郎准教授に依頼する。

4. 研究成果

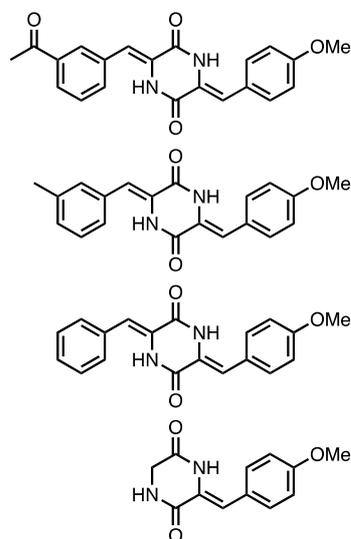


図 6. 合成した KPU-406 フラグメント誘導体の構造

KPU-406 の化学構造を基盤とする誘導体の開発: KPU-406 の *p*-メトキシフェニル構造を固定し、ベンゾフェノン構造を短縮したフラグメント誘導体を合成した。(図 6) 今後、これらフラグメント誘導体の構造と γ -チューブリンへの結合親和性の相関を検討することで、活性発現に寄与する構造の探索に繋がると考えている。

γ -チューブリンに選択的・非選択的な誘導体の開発: チューブリン選択性を有さない DKP 誘導体として、2-ピリジル型 DKP である KPU-300 の構造を基に複数の誘導体を合成した。(図 7) KPU-406 と共通であ

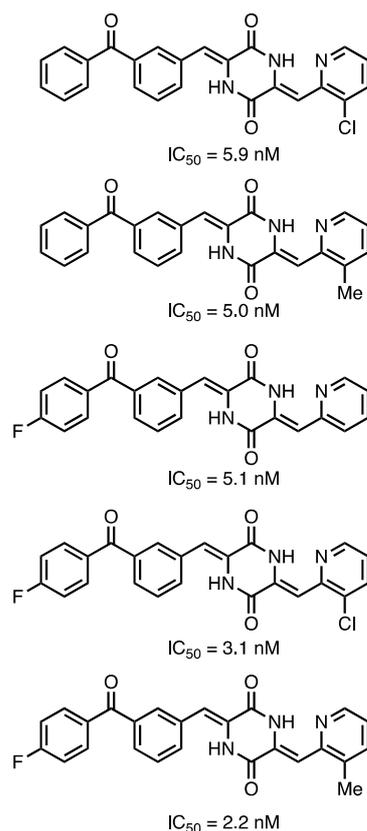


図 7. 活性が向上した KPU-300 誘導体の構造と殺細胞活性

るベンゾフェノン構造を維持し、ピリジン環上に置換基を導入した誘導体、並びに殺細胞活性の向上を指標に抗がん剤創製を目指しベンゾフェノン構造を修飾した誘導体合成の結果、リードとした KPU-300 よりも強い殺細胞活性を有する有望な抗がん剤候補化合物の創製に成功した。と同様、得られた高細胞障害性誘導体の γ -チューブリンに対する親和性を評価し、殺細胞活性及び構造との相関を検討することで有望な新規抗がん剤、あるいは抗がん剤シードの発見につながる成果となるだろう。

水溶性プロドラッグの創製：DKP 誘導体に共通の課題である難水溶性は、新規抗がん剤の創製に向けた探索においても課題となることが懸念された。そこで、Plinabulin の水溶性プロドラッグ化法を応用し、本研究におけるリード化合物のひとつである KPU-300 を基盤とし、水溶性プロドラッグの創製を目指した。水溶性補助基として、以前報告したセリン⁶ やカルニチン⁷ などのヒドロキシ基含有アミノ酸に変わり、より高い水溶性が期待できるジカルボン酸型のアミノ酸であるアスパラギン酸を選択し、水溶性の確保を目指した。炭酸セシウムを用いた DKP 環のモノラクチム構造への変換、アセタールリンカーを介したアルキン構造の導入、Huisgen 反応を用いた水溶性補助基の導入とナトリウム塩への変換により KPU-300 の水溶性プロドラッグ体の創製に成功した。(図 8) 期待通り、

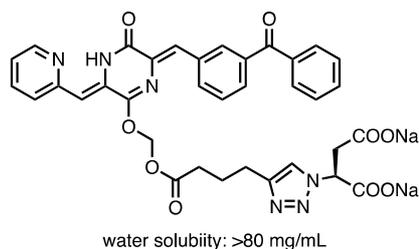


図 8. 水溶性プロドラッグの構造と溶解度

得られたプロドラッグ体は親化合物に比べて 80 万倍以上の水溶性 (>80 mg/mL) を示し、系中へのエステラーゼの添加により継続的な親化合物の再生を確認した。(図 9)

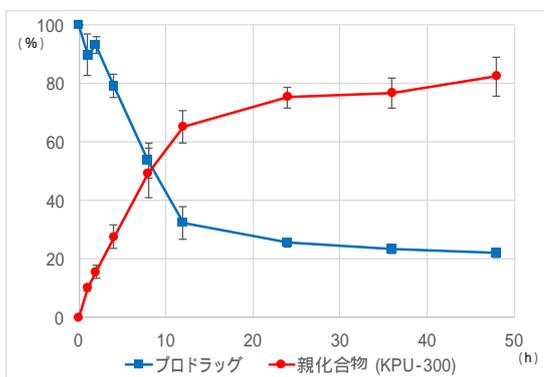


図 9. エステラーゼによる水溶性プロドラッグの分解と親化合物の再生

本手法は DKP 環を修飾部位としているた

め、KPU-406 やその誘導体にも容易に適用可能な手法であり、抗がん剤としての開発における課題の解決法として有力な手法となることが期待される。

ビオチン化プローブの創製：KPU-406 のベンゾフェノン構造にアミノメチル基を導入した誘導体を合成し、導入したアミノ基を起点にリンカーを介してビオチン構造を導入したビオチン化 KPU-406 を創製した。リンカー部位及びプローブとなる DKP 誘導体の最適化検討が必要となる可能性は残るが、今後、同誘導体が γ -チューブリンへの結合性を維持していることを確認し、1) ベンゾフェノン構造を光反応基として利用した結合部位解析、および 2) ビオチン化 KPU-406 誘導体を表面共鳴プラズモン (SPR) 法のセンサーチップに固定することで、 γ -及び α/β -チューブリンそれぞれに対する相対的な親和性を評価できる簡便なスクリーニング系の構築 (図 10) へと

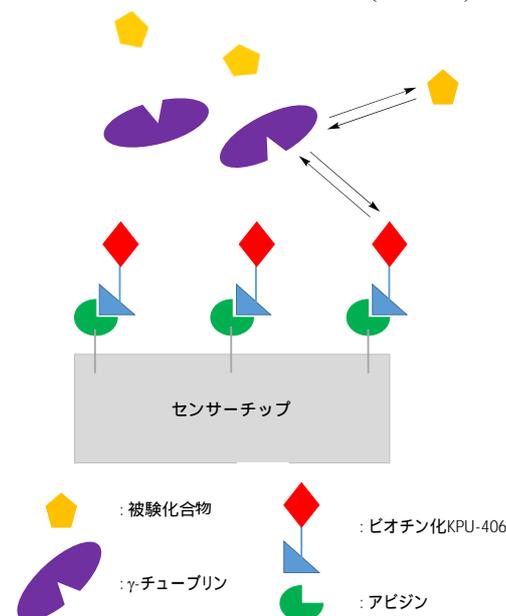


図 10. SPR 法を用いた γ -及び α/β -チューブリン高親和性誘導体スクリーニング系の概念図

展開していく計画である。なお、必要に応じてリンカー部位及びプローブとなる DKP 誘導体の最適化は随時検討する。

参考文献

1. Yamazaki, Y., Tanaka, K., Nicholson, B., Deyanat-Yazdi, G., Potts, B., Yoshida, T., Oda, A., Kitagawa, T., Orikasa, S., Kiso, Y., Yasui, H., Akamatsu, M., Chinen, T., Usui, T., Shinozaki, U., Yakushiji, F., Miller, B. R., Neuteboom, S., Palladino, M., Kanoh, K., Lloyd, G. K., Hayashi, Y. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Antimicrotubule Agents Phenylahistin Derivatives with a Didehydropiperazine -2,5-dione Structure, *J. Med. Chem.*, **55**, 1056-1071 (2012).

2. Yamazaki, Y., Sumikura, M., Masuda, Y., Hayashi, Y., Yasui, H., Kiso, Y., Chinen, T., Usui, T., Yakushiji, F., Potts, B., Neuteboom, S., Palladino, M., Lloyd G. K., Hayashi, Y. Synthesis and structure-activity relationships of benzophenone-bearing diketopiperazine-type anti-microtubule agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 4279-4289 (2012).
 3. Hayashi, Y., Yamazaki-Nakamura, Y., Yakushiji, F. Medicinal chemistry and chemical biology of diketopiperazine-type anti-microtubule and vascular disrupting agents, *Chem. Pharm. Bull.*, (Review) **61**, 889-901 (2013).
 4. Hayashi, Y., Takeno, H., Chinen, T., Muguruma, K., Okuyama, K., Taguchi, A., Takayama, K., Yakushiji, F., Miura, M., Usui, T., Hayashi, Y. Development of a new benzophenone-diketopiperazine-type potent anti-microtubule agent possessing a 2-pyridine structure, *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 1094-1098 (2014).
 5. Okuyama, K., Kaida, A., Hayashi, Y., Hayashi, Y., Harada, K., Miura, M. KPU-300, a Novel Benzophenone-Diketopiperazine-Type Anti-Microtubule Agent with a 2-Pyridyl Structure, Is a Potent Radiosensitizer That Synchronizes the Cell Cycle in Early M Phase, *PLoS ONE*, **10**, e0145995 (2015).
 6. Yakushiji, F., Tanaka, H., Muguruma, K., Iwahashi, T., Yamazaki, Y., and Hayashi, Y., Water-Soluble Prodrug of Antimicrotubule Agent Plinabulin: Effective Strategy with Click Chemistry, *Chem. Eur. J.*, **17**, 12587-12590 (2011).
 7. Yakushiji, F., Tanaka, H., Muguruma, K., Iwahashi, T., Yamazaki, Y., Hayashi, Y. Prodrug Study of Plinabulin Using a Click Strategy Focused on the Effects of a Replaceable Water-Solubilizing Moiety, *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 877-881 (2012).
 8. Muguruma, K., Yakushiji, F., Kawamata, R., Akiyama, D., Arima, R., Shirasaka, T., Kikkawa, Y., Taguchi, A., Takayama, K., Fukuhara, T., Watabe, T., Ito, Y., Hayashi, Y. Novel hybrid compound of a plinabulin prodrug with an IgG binding peptide for generating a tumor selective non-covalent-type antibody-drug conjugate, *Bioconjugate Chem.*, **27**, 1606-1613 (2016).
 9. Chinen, T., Liu, P., Shioda, S., Pagel, J., Cerikan, B., Lin, T-C., Gruss, O., Hayashi, Y., Takeno, H., Shima, T., Okada, Y., Hayakawa, I., Hayashi, Y., Kigoshi, H., Usui, T., Schiebel, E. The γ -tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle, *Nat. Commun.*, **6**, 8722 (2015); doi: 10.1038/ncomms9722.
 10. Yakushiji, F., Muguruma, K., Hayashi, Y., Shirasaka, T., Kawamata, R., Tanaka, H., Yoshiwaka, Y., Taguchi, A., Takayama, K., Hayashi, Y. Click strategy using disodium salts of amino acids improves the water solubility of plinabulin and KPU-300, *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 3623-3630 (2017).
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1件)
1. Yakushiji, F., Muguruma, K., Hayashi, Y., Shirasaka, T., Kawamata, R., Tanaka, H., Yoshiwaka, Y., Taguchi, A., Takayama, K., Hayashi, Y. Click strategy using disodium salts of amino acids improves the water solubility of plinabulin and KPU-300, *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 3623-3630 (2017).
- 〔学会発表〕(計8件)
1. 久保木里衣、林良樹、中澤大樹、知念拓実、田口晃弘、谷口敦彦、高山健太郎、臼井健郎、林良雄 KPU-300 を基盤とした微小管重合阻害剤の構造活性相関研究、日本薬学会第 137 年会、20170324 仙台 (口頭発表)
 2. 林良樹、六車共平、臼井健郎、林良雄、ジケトピペラジン型有糸分裂阻害剤 KPU-300 の構造活性相関研究、第 20 回 日本がん分子標的治療学会学術集会、20160530、大分
 3. Y. Hayashi, R. Kuboki, C. Sakuma, T. Chinen, A. Taguchi, K. Takayama, A. Taniguchi, T. Usui, Y. Hayashi, Structure-Activity Relationship Study of Anti-Microtubule Agent KPU-300 and Improvement of Its Solubility, The EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (EFMC-ASMC 2017) (国際学会).
 4. T. Shirasaka, K. Muguruma D. Akiyama, A. Taguchi, K. Takayama, A. Taniguchi, Y. Hayashi, Solid-phase assisted synthesis of hydrophobic plinabulin-hydrophilic peptide conjugate, 21st Korean Peptide Protein Society Symposium (21st KPPS) (国際学会).
 5. R. Kuboki, Y. Hayashi, C. Sakuma, M. Kobayashi, T. Chinen, A. Taguchi, K. Takayama, A. Taniguchi, T. Usui, Y. Hayashi, Structure-Activity Relationship Study of Anti-microtubule Agent based on KPU-300 Structure, 21st Korean Peptide Protein Society Symposium (21st KPPS) (国際学会).
 6. 林良樹, 久保木里衣, 佐久間千尋, 中澤大

輝,六車共平,知念拓実,田口晃弘,高山健太郎,薬師寺文華,谷口敦彦,臼井健郎,林良雄,微小管重合阻害剤 KPU-300 を基盤とした構造活性相関研究、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017 年

7. 白坂拓也、六車共平、秋山大地、田口晃弘、高山健太郎、谷口敦彦、林良雄、固相担持型ジスルフィド化試薬を応用した Plinabulin プロドラッグの創製研究、創薬懇話会 2017 in 加賀、2017 年。
8. 久保木里衣、林良樹、佐久間千尋、中澤大輝、知念拓実、田口晃弘、高山健太郎、谷口敦彦、臼井健郎、林良雄、ジケトピペラジン型微小管重合阻害剤 KPU-300 の構造活性相関研究、創薬懇話会 2017 in 加賀、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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
<http://hinka-toyaku.s2.weblife.me/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 良雄 (HAYASHI YOSHIO)
研究者番号：1 0 3 2 2 5 6 2

(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

()