

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21248

研究課題名(和文) 難治がん因子の脂質修飾を制御する擬似ペプチドの合理設計

研究課題名(英文) Rational design of peptidomimetic inhibitors for posttranslational lipidation of K-Ras

研究代表者

大神田 淳子 (Ohkanda, Junko)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：50233052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：進行性KRas変異がんに対する効果的な治療薬の開発が望まれている。本研究では、KRasの活性化に必須な脂質修飾に着目し、KRasと修飾酵素間のたんぱく質間相互作用の作用面と活性サイトを1分子認識する中分子化合物を、修飾酵素とのドッキング計算による合理設計に基づいて有機合成化学的に調製した。また種々の類縁体を調整しKRasのC末端の脂質修飾阻害を指標とした構造-活性相関研究を実施した結果、KRasのファルネシル化およびゲラニルゲラニル化を低nMで阻害し癌細胞の増殖を抑制する新規化合物を見出すことに成功した。以上の結果はKRas脂質修飾阻害剤設計に新たな指針を提供しうるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性難治がんであるKRas変異がんは国内のがん患者数の約20%を占めると推測されており、効果的な治療薬の開発が望まれている。最近認可されたKRasコバレント阻害剤は適用範囲が限られており、新たな切り口による分子戦略が求められている。本研究のコンセプトはKRasそのものを標的とする従来の創薬戦略と異なりKRasの脂質修飾に関わるたんぱく質間相互作用を標的とする点で独自性があるうえ、本研究により既存の阻害剤を凌駕する高活性化化合物が得られた成果は、KRas標的型抗がん剤の新たな設計指針を提案し進行性難治癌医療の発展に資する知見を提供するものと考えられる点で学術的および社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：KRas mutant cancer, which is an advanced intractable cancer, accounts for about 20% of cancer patients in Japan and the development of effective therapeutic agents is urgently needed. In this study, we focused on the posttranslational lipid modification essential for KRas activation, and rationally designed bivalent mid-sized compound that simultaneously recognize both active site and the PPI interface between KRas and farnesyltransferase and Type-1 geranylgeranyltransferase. Structure-Activity-Relationship study resulted in a compound which showed low nanomolar inhibition activity both farnesylation and geranylgeranylation of C-terminus of KRas. Furthermore, cell-based evaluation indicated that compound suppress cell proliferation effectively. These results may open a way toward a new molecular strategy against KRas inactivation targeting its posttranslational modification.

研究分野：生物有機化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：KRas 脂質修飾 dual阻害剤 ペプチドミメティクス たんぱく質間相互作用 中分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行性難治がんの中の KRas 変異がんは膵臓がんの 98%、大腸がんの 45%に見出され、国内の患者数は全てのがん患者の約 20%と推測されている。KRas 変異がんは増殖や転移が速く薬剤耐性を示す難治がんとして知られているが、分子標的薬の開発には至っていなかった。最近 G12C 変異 KRas コバレント阻害剤が非小細胞肺癌治療薬として認可されたが、一般的な G12D 変異 KRas には効果がない。難治がん創薬に向けて新たな切り口による KRas の不活性化を可能とする分子戦略が求められている。

(2) 2000 年代に Ras の翻訳後脂質修飾を標的とした臨床試験が実施されたが、KRas 変異がんには効果がなく中止された。我々は先行研究において、KRas のたんぱく質間相互作用を標的とする中分子を開発し [1]、K-Ras の脂質翻訳後修飾を低濃度で阻害することを明らかにしたが [2]、分子内のチオール基に由来する代謝不安定性により、詳細な作用機序解析や動物実験には至らなかった。

2. 研究の目的

(1) 含窒素複素環化合物を土台とすることにより、代謝安定性に優れた中分子阻害剤を合理設計して種々の誘導体を有機合成し、KRas の脂質修飾阻害活性を指標とする構造活性相関を検証して新規非チオール型ペプチドミメティクス含有 K-Ras 脂質翻訳後修飾 dual 阻害剤を創出する。

(2) 細胞実験により化合物の K-Ras 脂質修飾阻害活性および増殖阻害活性を検証し、K-Ras 翻訳後修飾を標的とする新規抗がん剤開発に向けた分子戦略を確立する。

3. 研究の方法

(1) 酵素基質複合体結晶構造に基づき CVIM 擬似ペプチドを合理設計する。含窒素複素環誘導体に代謝安定性に優れたイミダゾールを連結した基本骨格に、酵素-KRas のたんぱく質間相互作用面を認識するように設計した官能基を種々クリック反応またはアミド縮合で導入した誘導体を有機合成する。

(2) 遺伝子組み換え型ファルネシル転移酵素およびゲラニルゲラニル転移酵素を発現・精製し、環境応答性蛍光ラベルを付与した基質を用いた酵素活性試験にて化合物の in vitro 阻害活性を評価する。

(3) Ras 変異型膀胱がん細胞 T24 を用いた細胞実験により化合物の細胞増殖阻害活性を評価する。また KRas 変異型膵臓がん細胞 Panc-1 および Miapaca を用いて KRas 脂質修飾に及ぼす化合物の効果を検証する。

4. 研究成果

(1) KRas の C 末端 CVIM テトラペプチドの伸長配座の結晶構造に基づいて、ピペリジンにアミドもしくは尿素リンカーを介してメチオニン残基、また還元的アミノ化によりイミダゾールを組み込んだ化合物を設計した。ドッキング計算の結果、尿素誘導体は FTase 活性ポケットに CVIM 様の相互作用を保持しながら結合すること、また、イミダゾールの N3 が N1 より亜鉛への配位に

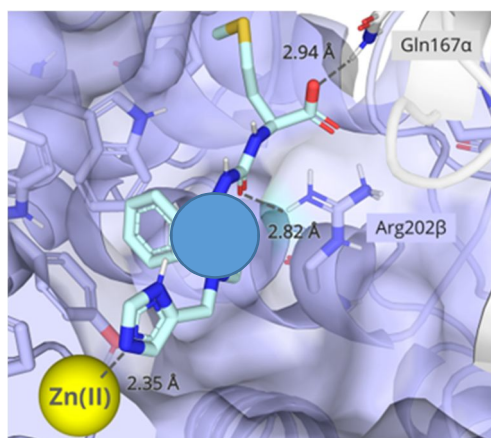


図 1. FTase とのドッキング計算の結果

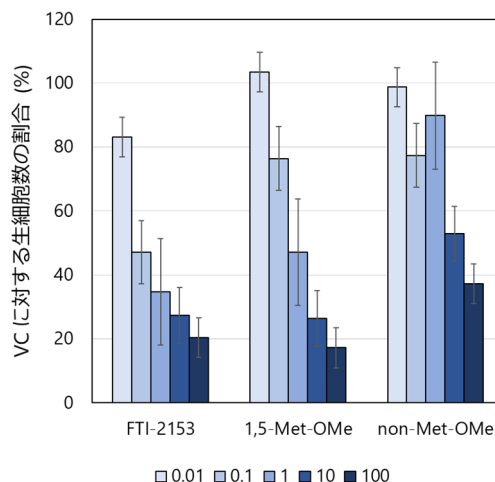


図 2. T24 細胞に対する増殖抑制活性

有利であり、N1 に種々の置換基の導入が可能なが示唆された (図 1)

(2) 化合物は、含窒素複素環誘導体のカルボキシル基に種々のアミノ酸を縮合した後、置換イミダゾールとの還元的アミノ化により合成した。イミダゾールの位置選択的アルキル化は、トシル基による位置選択的アミノ保護により高収率で達成した。

(3) In vitro 酵素活性試験は、環境応答性蛍光基であるダンシル基を付与した K-Ras C 末端オリゴペプチドを基質として大腸菌からラット FTase および GGTase-I を発現し His-Tag を用いた affinity 精製により単離して用いた。評価の結果、アミド型化合物の活性は低かった一方、尿素型 N-1,5 ベンジル置換体が FTase に対して低 nM レベルの顕著な阻害活性を示すことが明らかになった。1,4 置換体は不活性であり、イミダゾール窒素上の置換基の位置異性体に顕著な構造活性相関が見出され、ベンジルの芳香環と酵素活性ポケット内のアミノ酸残基との相互作用が示唆された。また、アミノ酸残基としてアラニン、フェニルアラニンを持つ化合物はいずれも低活性であり、メチオニン残基が優れていることが判った。

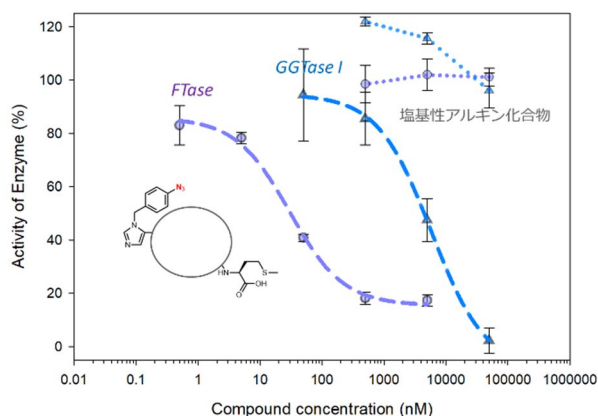


図 3 . アジドペプチドミメティクスと塩基性アルキン化合物の dual 阻害活性

(4) 膀胱がん細胞 T24 を用い WST 法にて増殖阻害活性試験を行った。その結果、1,5 置換体が既存の阻害剤に匹敵する阻害活性を示した (図 2) 。一方、無置換体の活性は弱く、酵素阻害活性と相関する結果となった。

(5) 上記で開発した新規非チオール型ペプチドミメティクスをもとに、酵素表面認識部位を連結した 2 座型阻害剤を設計した。化合物には FTase と GGTase の活性ポケットと酸性 PPI 作用面を 1 分子で同時認識する機能を期待する。そこで、イミダゾールにアジド基を導入し、適切なスペーサーを介して塩基性官能基を導入することとした。ドッキング計算の結果に基づいてスペーサー長として C6 を選択した。

(6) レジオ選択的ベンジル化により調製した 1,5-p-アジドベンジル含有イミダゾール誘導体を合成した後、メチオニン残基を縮合した複素環誘導体に還元的アミノ化により連結した。このペプチドミメティクスに、C6 スペーサーの先端に塩基性官能基を含む PPI 作用面認識部位を連結させたアルキン誘導体をクリック反応によりカップリングして目的化合物を合成した。

(7) 各種合成品の FTase および GGTase-I に対する dual 阻害活性を評価した。1,5-p-アジドベンジル含有化合物は、FTase に対してサブ nM の極めて強力な阻害活性を示した (図 3) 。GGTase-I に対しては若干劣るもののサブ μM 濃度の良好な活性を示し、dual 阻害剤として機能することが判った。なお表面認識部位である塩基性アルキン化合物は、両酵素に対して阻害活性は全く示さなかった。一方、両者を連結した 2 座型化合物の FTase 阻害活性は低 nM とアジド誘導体に比べて一桁ほど活性の低下が見られた。この原因は、アジドをトリアゾールに変換した結果ベンジルと活性ポケット内のアミノ酸残基との相互作用が弱まったことが考えられた。一方興味深いことに GGTase-I に対する活性はアジド誘導体と比べて同程度に維持される結果となり、表面認識部位の付与による活性の向上が示唆された。結果として、2 座型化合物の FTase/GGTase-I 阻害活性の差はアジド体と比べて 20%程度に狭まっており、dual 阻害剤としての機能が改善された結果となった。

(8) 以上のように、低 nM の活性を持つ非チオール性 KRas 脂質修飾酵素 dual 阻害剤の開発に成功した。今後は本化合物の改良型を動物による抗腫瘍活性試験に供し、KRas 変異がん治療薬としての機能を検証する。以上の結果は、KRas 脂質修飾阻害剤設計に新たな指針を提供しうるものと考えられる。

< 引用文献 >

- S. Machida, N. Kato, K. Harada, J. Ohkanda, J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 958-963.
- M. Tsubamoto, T. Le, M. Li, T. Watanabe, C. Matsumi, P. Parvatkar, H. Fujii, N. Kato, J. Sun, J. Ohkanda, Chem. Eur. J. 2019, 25, 13531-13536.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 堀内直己、杉野文俊、大神田淳子
2. 発表標題 ペパリジン含有KRas脂質修飾阻害剤の合理設計と活性評価
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Ohkanda
2. 発表標題 A rational approach for disrupting posttranslational lipid modification of K-Ras
3. 学会等名 第18回赤堀コンファレンス（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大神田 淳子
2. 発表標題 アカデミアで取り組む薬剤の設計戦略
3. 学会等名 ペインクリニック学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naomi Horiuchi, Fumitoshi Sugino, Junko Ohkanda
2. 発表標題 Design, synthesis, and evaluation of non-thiol bivalent dual inhibitors for KRas lipid modification
3. 学会等名 PacifiChem2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Junko Ohkanda	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature, Singapore,	5. 総ページ数 pp 77-96
3. 書名 "Chemical Approach Toward Controlling of Transient Protein Interaction" In Middle Molecular Strategy	

〔産業財産権〕

〔その他〕

THE OHKANDA RESEARCH LAB/CHEMICAL BIOLOGY LAB http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/lab/johkanda/index.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------