

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670129

研究課題名(和文) 中和抗体様作用をもつ低分子化合物創出の試み

研究課題名(英文) In silico screening of small molecule compounds for substitution of neutralizing antibodies.

研究代表者

大池 正宏(Oike, Masahiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70271103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TGF- $\beta$ 1蛋白と結合して中和抗体様に作用を阻害する低分子化合物の開発に向けた萌芽的検討を行った。TGF- $\beta$ 1蛋白のII型受容体との結合部位全域、結合部位の狭い窪み、受容体結合部位とは異なるアロステリック部位、の三箇所と仮想化合物との結合親和性を計算し、各々への結合親和性が高い化合物の実際のTGF- $\beta$ 1阻害効果を、肺癌細胞株A549の上皮間葉移行を指標に検討した。その結果、アロステリック部位と親和性が高い化合物が阻害作用を示す確率が最も高く、この領域を標的として中和抗体様低分子化合物が開発できる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop small molecular compounds that bind and suppress TGF- $\beta$ 1 protein. I set three binding sites on the surface of TGF- $\beta$ 1 protein, i.e., whole binding region to type II TGF- $\beta$  receptor (TGFBR2), electrostatic pocket of TGFBR2 binding region, and allosteric electrostatic pocket outside the receptor binding regions. Then I calculated binding affinities of virtual small molecular compounds to these binding sites, and examined the effects of high affinity compounds on TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells. The results were that compounds that had high binding affinity to allosteric site showed the highest possibility of inhibition. This study indicates that effects of TGF- $\beta$ 1 can be suppressed by small molecular compounds that allosterically affect binding of TGF- $\beta$ 1 to TGFBR2.

研究分野：薬理学

キーワード：インシリコスクリーニング TGF- $\beta$ 1 阻害薬 上皮間葉移行

## 1. 研究開始当初の背景

上皮組織に由来する癌細胞が転移するには、上皮間葉移行(以下 EMT)により間葉系形質を獲得して癌集塊から離脱遊走する必要があり、EMT は癌の転移再発の治療標的として注目されている。我々は血管内皮細胞が隣接する癌細胞に EMT を誘導し、これが二種類の TGF (TGF<sub>1</sub> と TGF<sub>2</sub>) によることを見出した (BBA1830: 4470-4481, 2013)。

内皮による EMT 誘導を少ない副作用で阻害するには TGF<sub>1</sub> と TGF<sub>2</sub> を阻害する中和抗体の併用が最も適するが、高い製造コストの抗体医薬を併用することは実用的ではない。また TGF 受容体はリガンド選択性が高くない上に TGF ファミリー蛋白は多くの生理機能も担うため、受容体阻害薬には各種の副作用が予想される。従って、抗体医薬と同様に高い選択性で TGF<sub>1</sub> と TGF<sub>2</sub> に結合して受容体との結合を阻害する低分子化合物を作成できれば、癌転移阻害が可能であると思われる。さらに、TGF は EMT 誘導以外にも各種の線維性疾患や慢性疲労症候群にも関与していることから、TGF の作用阻害方法の選択肢が増えることはこれらの疾患治療の点でも意義深いものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、TGF 蛋白の受容体結合を中和抗体と同様にリガンド(TGF)側に結合して阻害する低分子化合物の創出に向けた萌芽的検討を行うことを目的とする。

本研究では TGF<sub>1</sub> を標的とし、その II 型 TGF 受容体(TGFBR2)との結合部位に親和性が高い化合物を *in silico* で検索する。結合親和性が高い順に化合物を入手し、*in vitro* の検討によってその TGF<sub>1</sub> の EMT 誘導阻害作用を検討する。これにより、TGF の中和抗体を代替できる低分子化合物の開発法を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 化合物のインシリコスクリーニング

TGF<sub>1</sub> の X 線構造解析データ(1kla.pdb)を解析し、化合物結合グリッドを設定した。結合グリッドの設定には FiatLux 社の MF myPresto と、産総研の創薬支援プログラム群 myPresto のうち MoISite 及び tpIgene を使用した。次に、myPresto のドッキングプログラム sievgene を使用し、仮想化合物とのドッキングシミュレーションを行った。化合物データベースには、200 万化合物の仮想データベース Ligand Box(産総研・分子量 300 前後)と、IBS 社の自然由来化合物データベース (7.5 万化合物・分子量 500 以上)を使用した。結合親和性の計算には九州大学の演算サーバシステム PRIMERGY CX400 を使用した。

各化合物の結合親和性計算の後、非特異的にどの蛋白とも結合しやすい化合物が高く評価されるのを防ぐために、予め各化合物と 181 個の対照蛋白との結合親和性を計算して得ていたデータと比較して TGF<sub>1</sub> 蛋白との結合がどの程度強いかをランク付けした (MTS 法)。これによって最終化合物順位を得たのち、3 種類の結合グリッドについて、ランク上位から 386 個(グリッド A)、30 個(グリッド B)、96 個(グリッド C)の化合物を購入し、次の *in vitro* での検討を行った。

さらにグリッド C については、効果を示したヒット化合物の情報で MTS 法の重み付けを行って再計算し(機械学習 MTS 法)、19 個の化合物を追加購入して検討した。

### (2) 候補化合物の効果検討

上皮由来の癌細胞が EMT によって間葉系細胞に変化する現象を利用して TGF<sub>1</sub> の阻害効果を検討した。

対照のヒト肺癌細胞株 A549 は敷石状の密集増殖を示すが、TGF<sub>1</sub> による EMT の誘導により線維芽細胞様の孤在性増殖に変化する。これをスクリーニングの指標とし、A549 が

TGF $\beta_1$ (0.5ng/ml)による線維芽細胞様変化から敷石状の増殖パターンに戻った化合物を選定した。さらに、スクリーニングによって選定された化合物については、EMT 誘導によって A549 に生じる E-カドヘリンの発現減少をウェスタンブロットティングと蛍光免疫染色によって解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1)化合物結合グリッド

本研究では、TGF $\beta_1$ の蛋白表面に以下のような3種類の化合物結合グリッドを設定した。

グリッド A TGFBR2 結合領域：TGF $\beta_1$ はホモ二量体蛋白で、構造外に露出する TGFBR2 との結合部位が受容体に結合することで二量体構造内の I 型受容体(TGFBR1)との結合部位が露出し、TGFBR1 から細胞情報が生じる。

はじめに、単量体 TGF $\beta_1$ の TGFBR2 結合領域の狭い結合部位を設定した(図 1)。これは、本研究の立案時に想定した化合物結合の標的的部位である。これと Ligand Box の化合物の結合計算を行った。

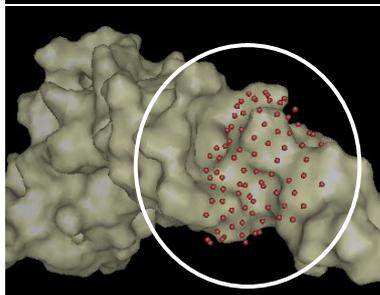
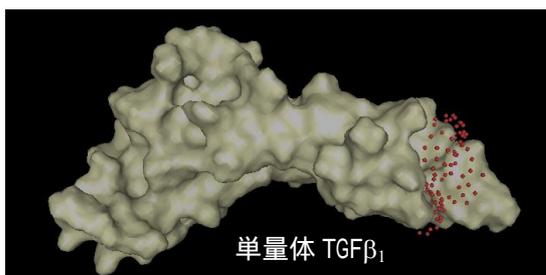


図 1. II 型 TGF 受容体結合領域に設定した化合物結合グリッド(赤点の部位)。

グリッド B - 広範囲の TGFBR2 結合領域：TGF とその受容体の結合面はいわゆる蛋白質間相互作用面(PPI)であるため、分子量が大きい化合物が効果を示す可能性がある。比較的大きな分子量からなる IBS 社の自然由来

化合物データベースをこれに使用し、その計算のため、より広範囲の TGFBR2 との結合部位全域の結合グリッドを次に設定した。

グリッド C - アロステリック阻害部位：蛋白の作用は構造の変化によって影響を受け、この構造変化が低分子化合物によって誘導される場合がある。この方法で TGF $\beta_1$ が抑制される可能性を検討するため、I 型及び II 型受容体結合部位とは異なる静電ポケットに化合物結合グリッドを設定し、Ligand Box 化合物との結合計算を行った。

##### (2)候補化合物の *in vivo*での効果検討

3 種類の化合物結合グリッドと仮想化合物との結合計算によって上位にランクされた候補化合物の実際の作用を、それぞれ検討した。

##### グリッド A 化合物の効果：

グリッド A との高い結合親和性が予想された低分子化合物 386 個(平均分子量 311)を検討した。これらの化合物のうち 11 個の化合物によって、TGF $\beta_1$ による A549 細胞の線維芽細胞様形態への形態変化が抑制され、細胞は TGF $\beta_1$ の存在下でも対照細胞の敷石状に

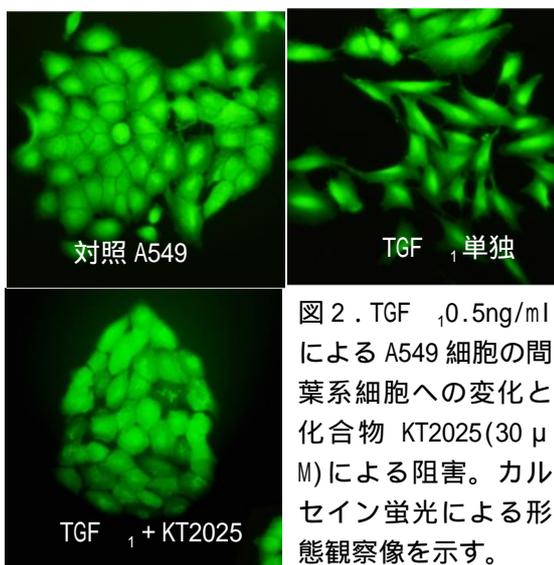


図 2. TGF $\beta_1$ 0.5ng/ml による A549 細胞の間葉系細胞への変化と化合物 KT2025(30  $\mu$ M)による阻害。カルセイン蛍光による形態観察像を示す。

近い増殖パターンを示した(図 2)。

さらに、TGF $\beta_1$ による上皮系接着因子 E-カ

ドヘリンの発現抑制をウェスタンブロットティングと免疫蛍光染色で検討したところ、細胞形態変化の抑制をもたらした 11 個の化合物によって、種々の程度に E-カドヘリンの発現が回復した。そのうち最も作用効力が高かった KT2025 による E-カドヘリン発現回復を図 3 に示す。

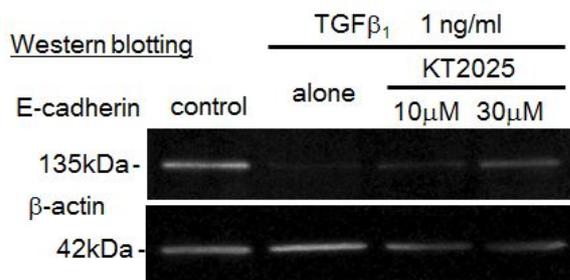


図 3. A549 細胞における TGFβ<sub>1</sub> 1ng/ml による E-カドヘリンの発現抑制のウェスタンブロットティング解析。KT2025 によって濃度依存性に回復した。

また、受容体結合部位の構造が類似している TGFβ<sub>2</sub> と TGFβ<sub>3</sub> の作用が KT2025 によって抑制されるかを同様の方法で検討したところ、これらの作用も TGFβ<sub>1</sub> への効果と近い程度に抑制され、化合物の TGFβ<sub>1</sub> 選択性は高くないと考えられた。

#### グリッド B 化合物の効果：

次に、LigandBox 化合物よりも分子量の大きな IBS 化合物とグリッド B との結合親和性計算のデータを用い、上位 30 個の化合物(平均分子量 632)を購入して作用を検討した。ところが、これらの化合物のなかにグリッド A の化合物のような効果を示したものはなかった。

検討した化合物数は少ないが、少なくともグリッド A の 386 個中 11 個という確率より高い確率でヒット化合物が得られるということはなく、PPI 面の比較的広い範囲を大きな分子量の化合物で覆うという戦略は、本研究で目的とする効果を得るには適さないと考えられた。

#### グリッド C 化合物の効果：

グリッド C は受容体結合部位とは異なるアロステリックな静電ポケットで、これと結合親和性が高い 96 化合物(平均分子量 332)の効果と同様の方法で検討した。

その結果、5 個の化合物によって、グリッド A 化合物による TGFβ<sub>1</sub> 抑制効果(図 2 および図 3) と同等以上の抑制効果が得られた。さらに、これらのヒット化合物の情報をもとに機械学習 MTS 法による化合物親和性の再評価を行い、19 個の化合物を追加購入して、この中から 2 個のヒット化合物を得た。

#### (3) 総合判定および今後の展開

以上の結果より、本研究で目的とした TGFβ<sub>1</sub> の作用を蛋白側への結合によって阻害する低分子化合物の開発について、以下が明らかにされた。

- ・ TGFβ<sub>1</sub> に結合する低分子化合物によってその作用を阻害することが可能である。
- ・ TGFβ<sub>1</sub> 蛋白構造内の TGFBR2 結合部位を標的とした場合よりも、蛋白内の受容体結合部位以外の静電ポケットに結合してアロステリック効果で受容体結合を阻害することを目指した方が、化合物が阻害効果を示す確率が高かった。

以上の結果とヒット化合物の情報をもとに、今後、より効果と特異性が高い TGFβ<sub>1</sub> 阻害薬をデザインすることができるものと思われる。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Kimura C, Konishi S, Hasegawa M, Oike M. Development of vascular muscle contractility by endothelium-derived transforming growth factor beta proteins. Pflügers Archiv. 466: 369-380, 2014.

[学会発表](計 3 件)

大池正宏、木村千稚：血管内皮による A549

細胞への EMT 誘導とその抑制の試み。第 66 回 日本薬理学会西南部会 2013 年 11 月 16 日、福岡。

大池正宏、木村千稚：内皮由来物質による血管平滑筋の組織様構築及び収縮の形成。第 67 回 日本薬理学会西南部会 2014 年 11 月 23 日、北九州。

大池正宏、木村千稚：血管及びリンパ管内皮からの恒常的な TGF $\beta$  の分泌とその腫瘍細胞における上皮間葉移行への関与。第 88 回 日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日～20 日、名古屋。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大池 正宏 (Oike, Masahiro)  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：70271103

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし