

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460150

研究課題名(和文)新規システイン化合物のKSP阻害に基づく次世代抗がん剤探索研究

研究課題名(英文) Novel cysteine derivatives for the next generation anticancer agents acting on KSP

研究代表者

小郷 尚久(Ogo, Naohisa)

静岡県立大学・薬学研究院・講師

研究者番号：20501307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Kinesin spindle protein (KSP) を標的に S-trityl-L-cysteine 誘導体の更なる構造最適化を行った結果、トリチル部 Ph 基をアルキル鎖で架橋し残りの Ph 基に置換基を導入することで KSP ATPase・細胞増殖阻害活性ともに IC50 値 nM レベルを達成し、ヒトがん移植ヌードマウスでも抗腫瘍効果を確認した。物性改善のための極性基導入や分子内硫黄原子を炭素原子にした誘導体の合成検討では、C 体中間体であるヒダントイン誘導体に強い細胞増殖阻害活性を認め、これら新規システイン誘導体は KSP 阻害に基づく次世代抗がん剤候補として有望であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We performed optimizations of S-Trityl-L-cysteine derivatives using docking modeling, which led to the discovery of novel derivatives with fused phenyl rings in the trityl group giving low nanomolar range KSP ATPase inhibition. The representative derivatives potently inhibited cell growth in correlation with KSP inhibitory activities and significantly suppressed tumor growth in the xenograft model. We also performed SARs focused on the amino acid to enhance the drug-like properties. As a result, the introduction of various polar groups to the carboxyl group on STLK was tolerable. Additionally, we tried to synthesize new chemotype, where the sulfur atom is replaced with carbon atom. Although the final compound is not still obtained, the hydantoin intermediate showed potent inhibitory activity. Thus, the novel cysteine related derivatives could be new lead compounds in the design of clinical candidates for next-generation KSP inhibitors as antitumor chemotherapies.

研究分野：創薬化学

キーワード：構造最適化 抗がん剤 構造活性相関 システイン誘導体 KSP 抗腫瘍効果 溶解度 プロドラッグ

1. 研究開始当初の背景

キネシンモータータンパク質のひとつである Kinesin Spindle Protein (KSP/Eg5) は、細胞周期における M 期の進行に重要な機能を担っている。タキソールやビンクリスチンなど従来の M 期作用薬は、幅広いがん種の治療薬として臨床現場で用いられているが、微小管への作用に起因した骨髄毒性や中枢・末梢神経障害などの副作用が問題である。KSP は、がん細胞でその機能を阻害すると、微小管に作用することなく細胞周期(M 期)を停止、アポトーシス誘導させるため、次世代抗がん剤開発の新たな標的として注目されている。それゆえ現在、KSP 阻害剤の研究開発は盛んであり、キナゾリン骨格(Ispinesib) やクロメン骨格(SB-743921)は米国にて第相試験が進行中であるが、未だ上市された薬剤はなく、KSP の抗がん薬としての有用性検証のために、異なる特性(骨格、物性)を持った阻害剤の研究開発が急務となっている。

2. 研究の目的

KSP を標的に高活性で且つ良好な物性プロファイルを持つ新規リード化合物の創製を研究目的とする。申請者がこれまで合成してきた KSP 阻害作用を有するシステイン (S-trityl-L-cysteine, STLC) 誘導体を in vivo モデルで薬効評価検討する上では、以下の課題がある。すなわち、in vitro 活性の強度面(更なる活性の向上: IC₅₀ でナノレベル) 難溶解性など物性面での改善が必要であることが分かっている。そこで本研究にてこれらの問題点を解決し、更にはその阻害剤をツールとしたケミカルバイオロジー研究による KSP 阻害剤を臨床応用・展開するための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

申請者がこれまで合成してきた KSP 阻害作用を有するシステイン誘導体をもとに、活性向上を指向して、活性に影響するトリチル部の多様な変換、複素環導入や Ph 基同土をアルキル鎖で固定化した化合物を合成し、その KSP 阻害・細胞増殖阻害活性を評価する。物性改善のため、活性に影響しないカルボキシル部への極性基導入やエステル化などの検討、更に分子内硫黄原子を炭素原子に変換した誘導体合成を検討し、KSP 阻害剤としての溶解性・安定性の向上を図る。

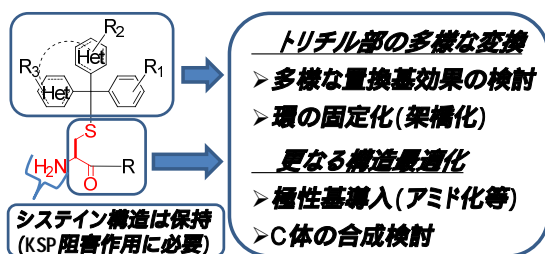


図1. 新規化合物デザイン

4. 研究成果

(1) 新規 STLC 誘導体 2 の発見と in silico ドッキング解析

システイン誘導体トリチル部の多様な最適化として、まずそれぞれの Ph 基への置換基効果(複数の官能基導入)やピリジン、チオフェンなど複素環への変換を検討したが、いずれの検討も大幅な活性向上は達成できなかった。しかし種々誘導体を合成する中で、1のトリチル部 Ph 環同土をエチレン鎖で架橋した化合物 2 は、1 と比べて約 8 倍 ATPase 活性向上することを見出した(図 2. A)。

そこで本現象を理解する意味で、別に報告されていた STLC 誘導体(4-CI 体)の共結晶構造を基にして AMBER12 による 2 の binding mode 解析を行った(図 2. B)。その結果、2 のシステインアミノ酸部は元のリガンド 4-CI 体と同じ結合様式であり、さらにはトリチル部 Ph 基もそれぞれ元のリガンドとほぼ同じ向き、角度で配位することが示された。興味深いことに STLC に導入したエチレンリンカーは、KSP の Tyr211, Leu214 との間において新たな van der Waals 相互作用が示唆され、本寄与が STLC との活性との違いであると考えられた。本モデルからは、架橋していない Ph 環への置換基効果が期待できたため、実際に置換基導入体を合成することとした。

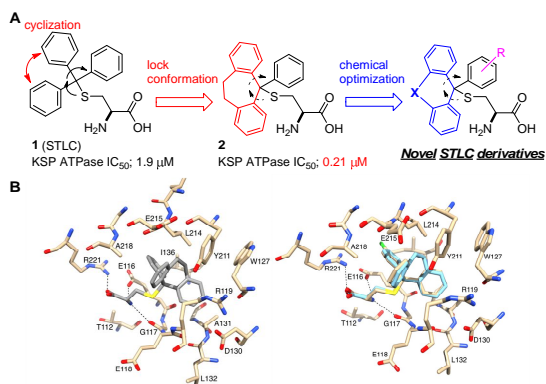
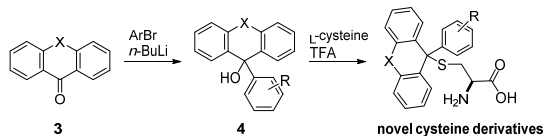


図 2. 誘導体 2 の構造と KSP へのドッキング解析

(2) 合成

目的化合物の合成は、以下に示すスキームで行った。



市販の臭化アリルを n-BuLi でリチオ化し対応するケトン 3 との反応によりアルコール体 4 とした後、TFA 存在下 L-システインと反応させ目的の誘導体を合成した。

(3) 構造活性相関

合成した誘導体の KSP 阻害活性を評価した結果、化合物 2 の架橋していない Ph 基への置換基効果を確認することができた(表 1)。

すなわち申請者が以前に見出していた初期 SARs (1 vs. 1a and 1b) と同様、パラ位へ適度な大きさと脂溶性のある置換基効果を確認し、5a-d については KSP ATPase・細胞増殖阻害ともにナノモルオーダーの IC₅₀ 値と ispinesib と同等のポテンシャルを持つことが判明した。置換基の位置については、パラ位以外の位置では立体障害により活性低下したと推測できた(5e-j)。さらに架橋するアルキル鎖については、sp² 炭素原子のエチルリンカーでも高活性を維持することが判明した(6a-c)。また炭素-炭素結合を炭素-硫黄結合または酸素原子に変えても阻害活性に大きな影響はないことも判明した(5a vs. 7b and 8b)。興味深いことに環の大きさ、つまり架橋する原子数は 2 個が最適であり、1 原子と小さくしても 3 原子に大きくしても KSP 阻害活性は消失する結果となった(ex. 8b vs. 8a and 8c)。これらのことから KSP のアロステリックサイトにおいてシステイン誘導体のトリチル部 Ph 基は厳密に認識されており、それぞれが適切なコンフォメーションで KSP アミノ酸側鎖と疎水的相互作用することが高活性に繋がること示された。具体的には架橋する Ph 環同士をつなぐ原子数は 2 個、架橋していない Ph 基パラ位に脂溶性を持った適度な大きさの置換基導入が高活性に繋がること分かった。

表 1. 構造活性相関

compound	X	R	KSP ATPase IC ₅₀ (nM)	cytotoxicity IC ₅₀ (nM)
1 (STLC)	-	H	1899 ± 232	910 ± 58
1a	-	4-CF ₃	262 ± 17	216 ± 14
1b	-	4-OMe	166 ± 8.8	213 ± 4.4
2	-CH ₂ CH ₂ -	H	209 ± 34	325 ± 15
5a	-CH ₂ CH ₂ -	4-CF ₃	22 ± 1.7	12 ± 0.6
5b	-CH ₂ CH ₂ -	4-OMe	14 ± 1.2	28 ± 1.1
5c	-CH ₂ CH ₂ -	4-Me	9.3 ± 0.2	25 ± 1.1
5d	-CH ₂ CH ₂ -	4-Cl	11 ± 1.3	41 ± 0.6
5e	-CH ₂ CH ₂ -	4-Ph	1057 ± 118	1296 ± 54
5f	-CH ₂ CH ₂ -	4-PhO	306 ± 13	291 ± 6.3
5g	-CH ₂ CH ₂ -	4-t-Bu	301 ± 13	234 ± 13
5h	-CH ₂ CH ₂ -	3-CF ₃	238 ± 38	123 ± 7.0
5i	-CH ₂ CH ₂ -	3-Cl	160 ± 45	637 ± 33
5j	-CH ₂ CH ₂ -	2-Me	7811 ± 553	4587 ± 269
6a	-CH=CH-	4-CF ₃	36 ± 0.7	5.0 ± 0.3
6b	-CH=CH-	4-OMe	8.6 ± 1.1	2.6 ± 0.4
6c	-CH=CH-	4-Me	14 ± 1.6	3.4 ± 0.1
6d	-CH=CH-	4-Cl	12 ± 1.7	3.9 ± 0.1
6e	-CH=CH-	4-Ph	1403 ± 296	395 ± 4.7
7a	-O-	4-CF ₃	>20000	>10000
7b	-CH ₂ O-	4-CF ₃	75 ± 4.7	76 ± 2.4
8a	-S-	4-CF ₃	>20000	>10000
8b	-CH ₂ S-	4-CF ₃	61 ± 8.7	15 ± 0.9
8c	-CH ₂ CH ₂ S-	4-CF ₃	>20000	>10000

さらに、これら一連の誘導体間で KSP ATPase 阻害と細胞増殖阻害活性(ヒト大腸がん HCT-116 細胞株)に良好な相関性がみられた(図 3)。このことは、これらの誘導体が KSP を阻害することにより細胞増殖を阻害していることを示している。

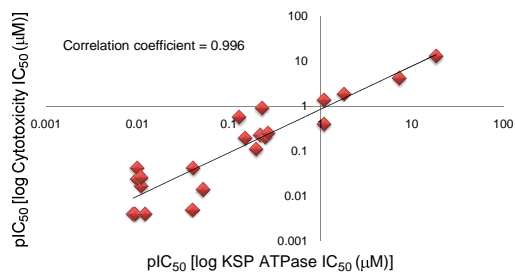


図 3. KSP ATPase 阻害と細胞増殖阻害活性相関 (Scatter plot of pIC₅₀(log Cytox.) vs. pIC₅₀(log KSP ATPase))

(4) KSP 阻害作用メカニズム解析

次に合成した新規誘導体を含めたシステイン誘導体の KSP 阻害作用メカニズム解析として、differential scanning fluorimetry (DSF) 解析を行った(表 2)。KSP に化合物が結合すると複合体の熱安定性が高まることを利用して、誘導体の KSP へのアフィニティと ATPase 阻害活性相関を考察した。その結果、KSP 阻害活性のない dibenzyl-L-cysteine では ΔT_m 0.0 度に対して、STLC では ΔT_m 5.0 度と明らかな温度上昇を確認した。さらにその程度は KSP 阻害活性が強まるほど上昇することが判明した。以前の 1b 固定化ビーズを用いた競合実験と同様、本結果からもこれらシステイン誘導体は KSP と直接結合することが証明でき、また誘導体の KSP ATPase 阻害活性は KSP へのアフィニティ強度と相関することも確認できた。

表 2. システイン誘導体 DSF 解析

Compound	X	R	KSP ATPase IC ₅₀ (nM)	温度差 (°C)
dibenzyl-L-cysteine	-	-	> 20,000	+0.0
1 (STLC)	-	-	1899 ± 232	+5.0
2	-CH ₂ CH ₂ -	H	209 ± 34	+8.0
1b	-	4-OMe	166 ± 8.8	+9.0
5b	-CH ₂ CH ₂ -	4-OMe	14 ± 1.2	+12.0

これら新規誘導体は、1a, 1b 同様他のキネシンには作用せず KSP 選択的に ATPase を阻害することを確認している。細胞への影響については、増殖阻害活性の他に細胞周期 M 期で止める有効濃度 (MI₅₀) を算出した。その結果化合物の MI₅₀ 値は細胞増殖阻害活性 IC₅₀ 値と同程度であり、また KSP 阻害特有の表現型を確認することもできた(図 4)。

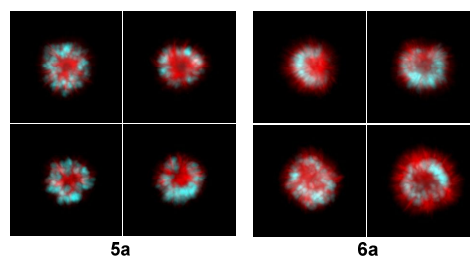


図 4. 誘導体 5a, 6a の表現型

(5) in vivo 動物モデルでの薬効

動物モデルでの評価に際しては、これらシステイン誘導体の溶解性が問題であった。し

かしその高い *in vitro* 活性から評価に付すことにした。まず、分子内のカルボン酸に着目しそのナトリウム塩を調製することで KSP 阻害活性に影響せず溶解性が向上することを確認した。STLC エチレン鎖架橋体 **2** と *in vitro* 活性向上した **5a-d**, **6a** について、ヒト大腸がん (HCT116 細胞) 移植ヌードマウスモデルにて *i.v.* 投与での薬効を試験した (表 2)。その結果、**2**, **5a**, **6a** については投与量依存的な抗腫瘍効果を確認でき、さらにその効果は *in vitro* KSP 阻害活性と相関することも確認できた。

表 3. 新規誘導体のヒト大腸がん (HCT116 細胞) 移植ヌードマウスモデルでの薬効

compound	dose (mg/kg)	T/C ^a (%)	mortality
2	150	23	0/6
2	75	43	0/6
2	25	62	0/6
5a	75	9	0/6
5a	25	21	0/6
5b	25	26	0/6
5c	25	19	0/6
5d	25	11	0/6
6a	25	12	0/6
6a	10	31	0/6

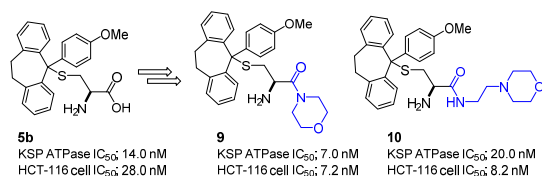
^a T/C (%) = (mean tumor weight of treated group) / (mean tumor weight of control group) × 100

本評価結果は投与量・投与ルート・投与タイミング等の検討を含めた最適化は行っていないため、今後より詳細な評価条件検討は必要である。しかし今回の *in vivo* 初期薬理評価でも強力な抗腫瘍活性を確認することができたことは、新規システイン誘導体の KSP 阻害に基づく抗がん剤候補としての可能性が示されたと考えられる。

(6) 更なる構造最適化

(6) 極性基導入

分子内のカルボン酸をナトリウム塩とすることにより溶解度向上するもののリード候補として十分とは言えないため、高活性な KSP 阻害システイン誘導体の更なる医薬品候補としての可能性を上げる意味で、物性改善に向けた検討を行った。具体的にはこれまでに得た SARs、すなわち KSP ATPase 阻害活性に影響しないカルボキシル部についてエステルやアミド結合を介した種々の極性基導入を検討した。化合物 **5a**, **5b** を出発原料として、アミノ基や水酸基を有する種々の極性基を導入し、評価した結果、カルボキシル部にモルホリノ基を導入した誘導体 **9**, **10** では、KSP ATPase 阻害・細胞増殖阻害活性 (ヒト大腸がん HCT-116 細胞株) 共に IC₅₀ 値ナノモルレベルの高活性を維持していることが判明し、分子全体の極性バランスにバリエーションを持たせた高活性 KSP 阻害剤を創製することができた (図 5)。



5b KSP ATPase IC₅₀: 14.0 nM
HCT-116 cell IC₅₀: 28.0 nM

9 KSP ATPase IC₅₀: 7.0 nM
HCT-116 cell IC₅₀: 7.2 nM

10 KSP ATPase IC₅₀: 20.0 nM
HCT-116 cell IC₅₀: 8.2 nM

図 5. 極性基導入した新規誘導体 **9**, **10** の構造と KSP 阻害活性

(6) C 体合成検討

システイン誘導体の代謝安定性を高める意味で分子内の S を生物学的等価体 C に変換した誘導体合成を検討した。まず Target として化合物 **5b** の C 体 **13** の合成に取り組んだ。(2) の合成項で示した、従来合成法の間mediateでもあるトリチルアルコール **4** を出発原料とし、アリル基 (C3 ユニット) の導入と続くオレフィンの還元、酸化によりアルデヒド体 **11** へと導いた。現在、アルデヒド体に KCN, (NH₄)₂CO₃ を用いたヒダントイン体 **12** の合成まで完了することが出来ており、今後適切な加水分解反応条件を確立し、目的化合物とする (図 6)。

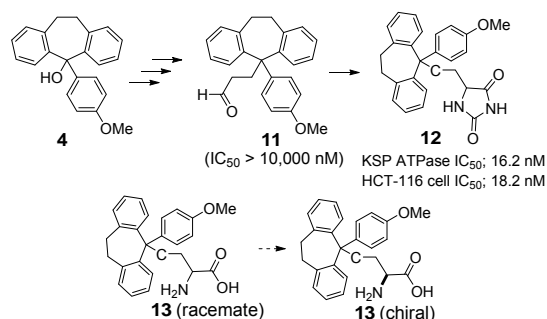


図 6. C 体合成スキームと中間体 (**11**, **12**) の KSP ATPase 阻害活性

これらの中間体を *in vitro* 評価したところ、興味深いことにヒダントイン体 **12** の KSP ATPase 阻害は IC₅₀ 値ナノモルレベルと高活性であった。本知見は、これまでの SARs とドッキングシミュレーションでは説明し難い結果であり、今後共結晶解析を含めたより詳細な構造活性相関研究を実施する。

以上、本研究成果からこれら新規システイン誘導体は KSP 阻害に基づく次世代抗がん剤候補として有望であることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Naohisa Ogo, Yoshinobu Ishikawa, Jun-ichi Sawada, Kenji Matsuno, Akihiro Hashimoto, and Akira Asai: Structure-Guided Design of Novel L-Cysteine Derivatives as Potent KSP Inhibitors. ACS Med. Chem. Lett., 査読有, 6, 1004-1009 (2015) DOI: 10.1021/acsmedchemlett.5b00221

Hideshi Yokoyama, Jun-ichi Sawada, Shiori Katoh, Kenji Matsuno, Naohisa Ogo, Yoshinobu Ishikawa, Hiroshi Hashimoto, Satoshi Fujii, and Akira Asai: Structural basis of new allosteric inhibition in kinesin spindle protein Eg5. ACS Chem. Biol., 査読有, 10, 1128-1136 (2015) DOI: 10.1021/cb500939x

小郷尚久、浅井章良：新規 KSP 阻害剤の創製 - システイン誘導体の合成と構造活性相関 MEDCHEM NEWS、総説、25 No.2 88-94 (2015)

〔学会発表〕(計6件)

小郷尚久、澤田潤一、石川吉伸、松野研司、橋本章弘、浅井章良：新規システイン誘導体の KSP 阻害に基づく次世代抗がん探索研究、日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会、2014年6月9日～13日、大阪大学(大阪府豊中市)

Naohisa Ogo, Jun-ichi Sawada, Yoshinobu Ishikawa, Kenji Matsuno, Akihiro Hashimoto, and Akira Asai: Novel cysteine derivatives for the next generation anticancer agents acting on KSP, 25th EORTC-NCI-AACR symposium Molecular targets and cancer therapeutics, 2014年11月18日～21日、Centre de Convencions Internacional Barcelona (バルセロナ, スペイン)

小郷尚久、石川吉伸、松野研司、澤田潤一、浅井章良：新規 KSP 阻害剤の創製 - システイン誘導体の合成と構造活性相関 -、第32回メディシナルケミストリーシンポジウム、2014年11月26日～28日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

小郷尚久、三原寛貴、山根正敬、澤田潤一、浅井章良：KSP 阻害作用を有する新規システイン誘導体の抗がん活性、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日～10日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

小郷尚久、浅井章良：新規 KSP 阻害剤の創製 - システイン誘導体の合成と構造活性相関 -、第33回メディシナルケミストリーシンポジウム 次世代を担う研究者による「MCS 優秀賞」受賞招待講演、2015年11月25日～27日、幕張国際研修センター(千葉県幕張市)

Ryota Fukai, Naohisa Ogo, Masayoshi Yamane, Jun-ichi Sawada, and Akira Asai: Synthesis and evaluation of novel cysteine derivatives as next generation antitumor agents The 3rd International Conference on Pharma-Food、2016年11月17日～18日、日本平ホテル(静岡県静岡市)

〔その他〕

所属研究室ホームページ

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/tanaku/index.html>

MCS 優秀賞受賞(小郷尚久、第32回メディシナルケミストリーシンポジウム優秀賞受賞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小郷 尚久 (Naohisa Ogo)

静岡県立大学大学院・薬学研究院・講師

研究者番号：20501307