

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08366

研究課題名(和文) がん細胞を特異的に認識するKSP阻害に基づく革新的な抗がん剤探索研究

研究課題名(英文) Development of novel KSP inhibitors highly selective for cancer cells

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに創製してきた高活性オリジナルKinesin Spindle Protein (KSP) 阻害システイン誘導体のがん細胞への選択的な作用を持たせたデュアル作用薬創製を目的に、in silicoドッキング及びMDシミュレーション解析を行いKSP阻害に係わる重要なファーマコフォアを同定した。この結果を基にした構造最適化として、がん細胞で高発現しているGGTの基質部分構造を融合させたプロドラッグをデザイン合成した。本化合物はGGT存在下親化合物に変換され、その細胞増殖阻害活性はGGTの発現量と逆相関することから、がん細胞選択的に作用するプロドラッグとして有望であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

独自開発したKSP阻害システイン誘導体を基に、その阻害様式を共結晶構造やMD計算等駆使して明らかとしつつ、それらの情報を活かして今までにない次世代抗がん剤開発のためのリード化合物(プロドラッグ)を創製できたことはオリジナリティの高い研究成果であり、更にKSP自身の生物学的意義に関する研究の深化にもつながると考えられる。またこれらの研究成果は学会・論文発表を通じて社会に公表することにより、抗がん剤開発をはじめとした科学リテラシー向上にも貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To create novel kinesin spindle protein (KSP) inhibitors highly selective for cancer cells, we optimized the amino acid moiety of S-Trityl-L-cysteine derivative 1 using in silico modeling. Molecular docking and MD simulation were performed to investigate the binding mode. Consistent with the results of SARs, we found the amino group plays an important role to stabilize the interaction. Based on these findings and the structure of GSH a substrate of -glutamyltransferase (GGT), we designed the prodrug, N- -Glutamylated derivative 2 which could be hydrolyzed by GGT to produce 1. GGT is overexpressed on the cell membrane of various cancer cells. The KSP ATPase inhibitory activity of 2 was lower than 1 and LCMS analysis indicated 2 was converted to 1 only in the presence of GGT. Cytotoxicity of 2 was significantly attenuated in GGT-knockdown A549 cells. Those results suggest that 2 could be a promising prodrug that selectively inhibits the proliferation of GGT-expressing cancer cells.

研究分野：創薬化学

キーワード：デュアル作用薬 プロドラッグ MD解析 構造最適化 がん細胞選択的 GGT 次世代抗がん剤 システイン誘導体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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で用いられているものの、微小管への直接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課題である。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。KSP は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を停止しアポトーシスを誘導するため、抗がん剤開発の新たな標的として注目されてきた。しかしながら KSP を標的とした抗がん剤開発では、**ispinesib** や **filanesib** など複数の阻害剤が臨床入りしたものの好中球減少など、いわゆるがん選択性の低さ(副作用)により、いずれの臨床開発も順調に進んでいない現状がある。これら KSP 阻害剤のヒトがん細胞株での増殖阻害活性、ヒトがん移植ヌードマウスでの抗腫瘍効果は、上述のタキソールやビンクリスチンと比べ劣ってはいない。そのため KSP 阻害化合物にがん選択性を持たせるなど次世代型の新規抗がん剤開発に向けた基礎研究・開発が切望されている。

## 2. 研究の目的

これまでに申請者らは、**ispinesib** や **filanesib** など既に臨床入りしている KSP 阻害剤とは構造的に全く異なる新規高活性 KSP 阻害システイン誘導体を合成展開してきている。本研究目的は、その基本骨格に KSP 阻害活性とは別の生物活性を付与することによりがん選択性を向上させた新規デュアル作用化合物の創製である。すなわち、システイン誘導体に対して種々の構造変換や *in silico* 計算を検討することにより、元の高活性 KSP 阻害活性を維持したまま、がん細胞で高発現している酵素の基質機能を融合させるなどのデュアル作用を持つ次世代型 KSP 阻害化合物(プロドラッグ)の合成とその生物活性評価を行う。

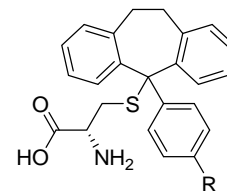
## 3. 研究の方法

申請者がこれまでに獲得している KSP 阻害システイン誘導体を基に、まず *in silico* ドッキングおよび MD シミュレーション計算による KSP とシステイン誘導体の複合体構造における相互作用解析、誘導体の更なる構造最適化を含めた MD 計算結果検証のための誘導体合成と評価、との知見を基に誘導体システイン部の構造修飾を行う。特にアミノ基変換として、がん細胞表面に高発現している酵素の基質構造を融合させたプロドラッグ化を検討する。これらの研究により KSP 阻害剤を臨床応用するための学術的な裏付けとなる基礎研究を行うと共に、分子全体の最適化を行い、最終的にがん細胞を特異的に認識し薬効を発揮する新規抗がん剤の創製を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) システイン誘導体と KSP の *in silico* ドッキング及び MD 解析

代表的な高活性 KSP 阻害システイン誘導体を図 1 に示す (**ACS MCL 2015**)。これらの構造的な特徴は、システイン硫黄原子に疎水性かつ立体的にかさ高いアリアル基を有することであるが、本研究期間中エチレン架橋していない Ph 環へのメトキシ基導入体 (**PVE138**) に関して KSP との複合体結晶構造を明らかにできている (**ACS Omega 2018**)。この情報 (**pdb:5zo7**) を参考にし、Ph 環トリフルオロメチル基導入体 (**1**) をリード化合物として選定し **molecular dynamics (MD)** 解析を行うことによりシステインアミノ酸部に関する KSP とのより詳細な相互作用解析を行った。尚、**1** を選定した理由としては、先のマウス *in vivo* 評価の際に白血球など血球系細胞への影響が比較的小さい点、また今後の合成展開を考慮して収率面が優れている点である。



R: CF<sub>3</sub> (**1**), OMe (**PVE138**), Me, Cl  
HCT116 cells GI<sub>50</sub>: 2 - 92 nM  
KSPATPase IC<sub>50</sub>: 1 - 23 nM

図1 システイン誘導体

まずドッキングソフト MOE を用いて **1** と KSP とのドッキング計算を行い(図 2.A) その **binding mode** を初期構造として MD 解析を行った(図 2.B)。

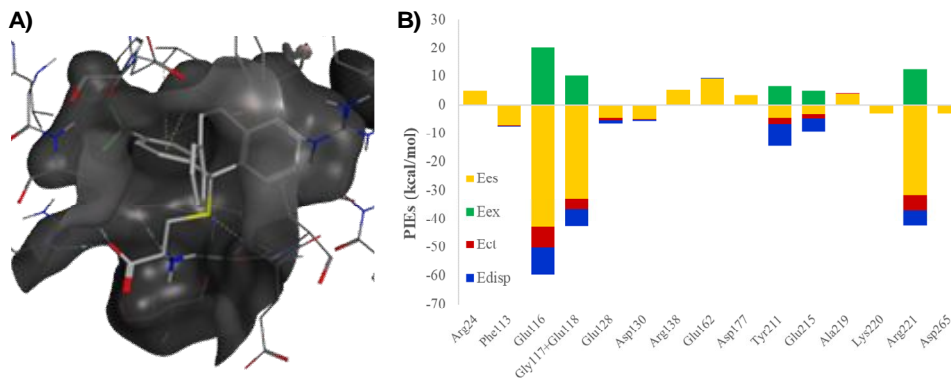


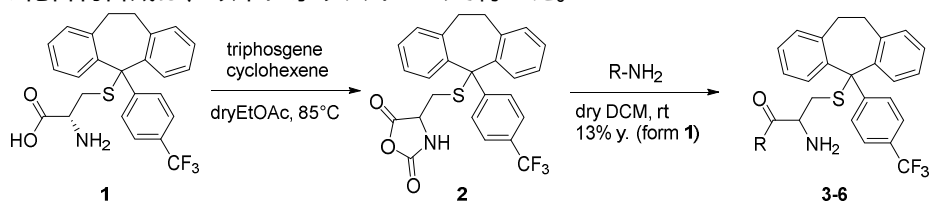
図2 1とKSPのドッキングモデル A)MOEを用いたドッキングポーズ B)MD解析(PIEDA)

その結果、**1** のシステインアミノ酸部はこれまで主に最適化を進めてきたトリチル部と同様に KSP との相互作用に重要であることが判明した。特にアミノ基に関しては KSP Glu116, Gly117 残基との水素結合による相互作用寄与が非常に大きく、カルボキシル基と Arg221 のそ

れよりも寄与が大きいことを究明した。すなわち、本システイン誘導体のアミノ基が **KSP** 阻害活性発現に必須のファーマコフォアであり、次にこのことを実際に構造変換した誘導体を合成・評価して確かめることとした。

## (2) 合成

所望の化合物合成は、以下に示すスキームで行った。



Scheme 1. Synthesis of amide derivatives.

これまでに確立している合成法により得た **1** に対して、トリホスゲンとの反応により **oxazolidine-2,5-dione** 中間体 **2** を得た後、種々のアミンとのカップリングにより所望の誘導体を合成した (**Scheme 1**)。

## (3) 構造活性相関

化合物 **1** のカルボキシル基に種々の置換アルキルアミンを導入しても **KSP** 阻害活性にあまり影響せず、高活性 (**KSP ATPase**  $IC_{50}$  値数十 nM レベル) を維持することが分かった (**Table 1**)。またアミノ基を **Boc** 化させた誘導体は **KSP ATPase** 阻害活性が消失した (図 3) ことから、先の **MD** 解析結果を支持する結果が得られた。

Table 1. SRAs of **1** derivatives

Compound	R	KSP ATPase $IC_{50}$ (nM)	HCT116 $GI_{50}$ (nM)
<b>1 (Lead)</b>	OH	14	28
<b>3</b>	$NH(CH_2)_3OH$	89	64
<b>4</b>	$NH(CH_2)_2NMe_3$	68	111
<b>5</b>	$NH(CH_2)_3Morpholine$	92	87
<b>6</b>	$NH(CH_2)_3Piperidine$	131	196

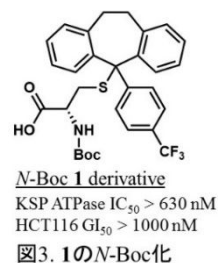


図3. **1**のN-Boc化

これらの結果は、カルボキシル基の変換は **1** の **KSP** 阻害活性を維持したまま種々の置換基導入 (抗体へのコンジュゲート等) が可能であること、またアミノ基をアシル化することにより **1** の **KSP** 阻害活性をマスクできる可能性を示している。

## (4) **KSP** 阻害システイン誘導体 **1** のプロドラッグ化

**GGT** とその基質構造に着目したプロドラッグデザインと合成

**1** のアミノ基に着目したプロドラッグとして、がん細胞表面でアミノ基 (親化合物 **1**) を生成するようなプロドラッグをデザインすることとした (図 4)。 **$\gamma$ -glutamyltransferase (GGT)** はグルタチオン (**GSH**) 代謝に関わる膜結合型酵素であり、多くのがん細胞で高発現が報告されている。**GGT** は **GSH** のグルタミル結合を加水分解し、**GSH** からグルタミン酸を切り離す触媒活性を有する。**1** と **GSH** は共にシステインを部分構造に持ち、また **GGT** は **GSH** の **Glu-Cys** 結合を加水分解することから、**1** のシステイン部を **GluCys** に変換したプロドラッグ **7** をデザイン・合成し種々の評価を行った。

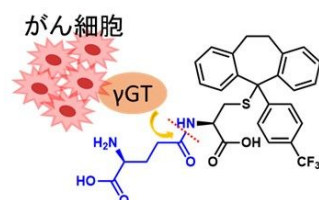
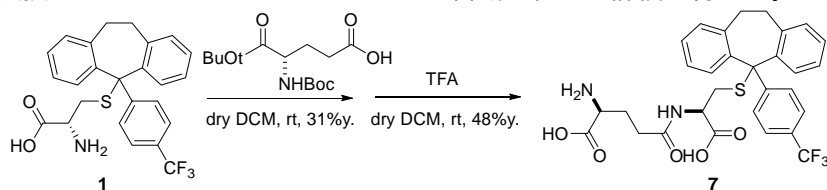


図4 化合物デザイン



Scheme 2. Synthesis of **7**

市販の保護 **Glu** を原料として **1** との縮合反応した後、**TFA** で脱保護することにより所望の化合物 **7** を合成した (**Scheme 2**)。

プロドラッグ **7** の評価

化合物 **7** の **KSP ATPase** 阻害活性 (**KSP ATPase**  $IC_{50}$ : 239 nM) は **1** と比べ減弱し、上述の **KSP** 阻害に対するアミノ基の重要性を明らかにできた。また **7** は **GGT** 存在下でのみ **1** へ代謝されることを **LC/MS** で確認し、**7** が **GGT** の基質となることも判明した (図 5)。

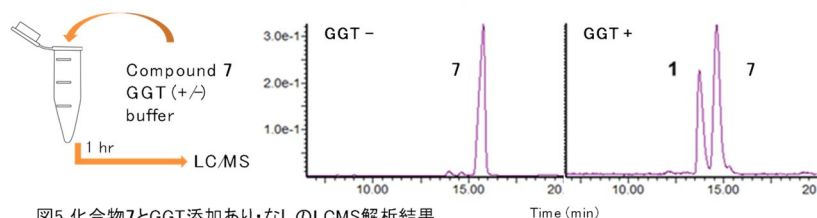


図5 化合物**7**とGGT添加あり・なしのLCMS解析結果

Time (min)

次にがん細胞株での増殖阻害評価を実施した。その結果、がん細胞でも **7** の増殖阻害活性は **1** と比べ減弱し、その減弱比率は **GGT** 発現量と逆相関する傾向であることが判明した。更にヒト肺基底上皮腺癌 **A549** 細胞株で **siRNA** を用い **GGT** をノックダウンした細胞株を用いて評価した結果、**7** の増殖阻害活性は **WT** と比べ有意に低下することも判明した (図 **6**)。

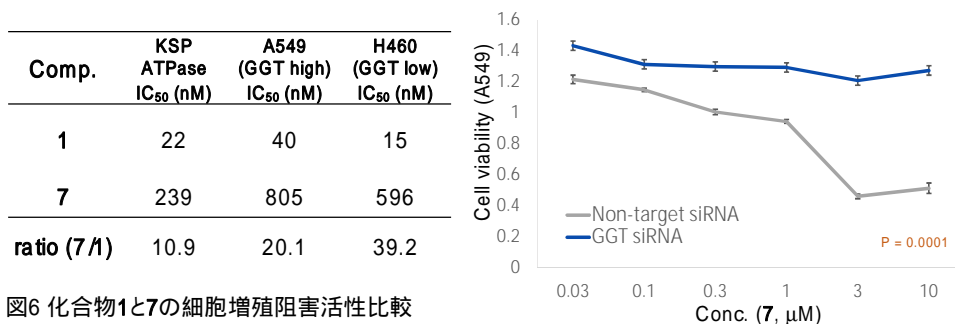
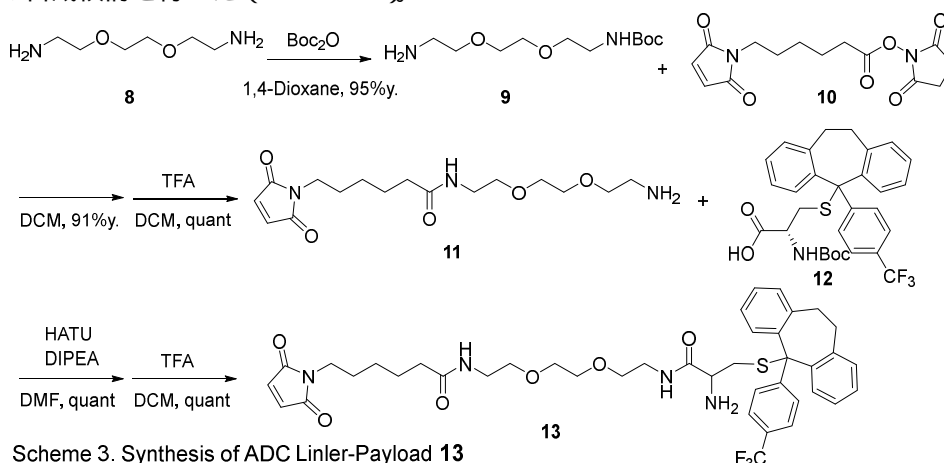


図6 化合物**1**と**7**の細胞増殖阻害活性比較

以上の結果から、**7** はがん細胞選択的に細胞増殖阻害作用を有するプロドラッグとして有望であることが示唆された。

### (5) 更なる構造最適化 (カルボキシル部変換によるがん選択性獲得への取り組み)

先の *in silico* モデリング MD 解析と構造活性相関研究より、**1** のカルボキシル部変換は化合物の **KSP** 阻害活性を保持したまま種々の構造変換が可能であることを示している。そこで **1** にがん細胞選択性を持たせるひとつの方策として、**Antibody-Drug Conjugate (ADC)** の **payload** としての可能性を探る研究を行った。**ADC** は近年抗がん剤開発における新たなモダリティとしても注目されているが、**KSP** 阻害剤を **payload** とした報告例は極めて少ない。まず、**1** のカルボキシル部を起点として **PEG** リンカーを導入した **Linker-Payload (13)** をデザインし、その合成検討を行った (**Scheme 3**)。



Scheme 3. Synthesis of ADC Linker-Payload **13**

市販のジアミン **8** を原料に常法によりモノ **Boc** 化した後、末端にマレイミド基を持つ **NHS** エステル **10** との縮合、続く **TFA** による脱保護により **11** を合成した。次にアミノ基を **Boc** 化した **1** (**12**) と **HATU** を縮合剤としてアミド体とした後、脱 **Boc** 化により所望の化合物 (**Linker-Payload**) **13** の合成を高収率で達成することができた。更にヒト大腸がん由来がん細胞株 **HCT116** 細胞にて **MTS** 試薬を用いて細胞増殖阻害活性を評価したところ、化合物接触 **72** 時間培養における **13** の **GI<sub>50</sub>** 値は **590 nM** であることも分かり、**ADC** の **Linker-Payload** として機能することが期待できる良好な結果を得ることが出来た。化合物 **13** は今後、実際に抗体との (**Cys** 残基を標的とした) **conjugate** を行い、**ADC** として評価を進めていく予定である。

### (6) まとめ

申請者がこれまでに獲得してきた **KSP** 阻害システイン誘導体を基に、*in silico* ドッキングおよび **MD** シミュレーション計算を活用して **KSP** 阻害に係わる重要なファオマコフォアを同定することが出来た。この結果は、実際に誘導体の更なる構造最適化にも有効であり、特にアミノ基変換として、がん細胞表面に高発現している **GGT** の基質部分構造を融合させたプロドラッグ化 (化合物 **7** の発見) に繋がった。種々の *in vitro* 評価により、**7** はがん細胞選択的に細胞増殖阻害作用を有するプロドラッグとして有望であることが示された。またカルボキシル部変換体では **ADC** 化に向けた **Linker-Payload** の合成ルートを確認することが出来た。これらの研究により **KSP** 阻害剤を臨床応用するための学術的な裏付けとなる基礎研究の前進に貢献することができた。

以上本研究成果から、新規システイン誘導体は **KSP** 阻害に基づくプロドラッグをはじめとした次世代抗がん剤開発のためのリード化合物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2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hideshi Yokoyama, Jun-ichi Sawada, Kohei Sato, Naohisa Ogo, Nanami Kamei, Yoshinobu Ishikawa, Kodai Hara, Akira Asai, and Hiroshi Hashimoto	4. 巻 3
2. 論文標題 Structural and Thermodynamic Basis of the Enhanced Interaction between Kinesin Spindle Protein Eg5 and STLC-type Inhibitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 12284 12294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.8b00778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小郷尚久	4. 巻 10
2. 論文標題 共有結合フラグメントライブラリーを用いた生体内標的タンパク質の網羅的な探索	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 15-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taiki Ichida, Ryota Fukai, Yumeka Ikeda, Naohisa Ogo, Nao Miyoshi, and Akira Asai
2. 発表標題 Design and synthesis of novel linker-payload with S-trityl-L-cysteine derivative for antibody-drug conjugates
3. 学会等名 第24回 静岡健康・長寿学術フォーラム（静岡）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深井 椋太、小郷尚久、市田泰輝、山根正敬、三好奈央、浅井章良
2. 発表標題 がん細胞選択性向上を指向したS-trityl-L-cysteine (STLC)誘導体のプロドラッグデザイン
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム（八王子）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田潤一、松野研司、小郷尚久、浅井彰良
2. 発表標題 M期キネシンKSP阻害剤と相乗的に細胞死を誘導する阻害剤の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市田泰輝、深井椋太、池田有明香、三好奈央、小郷尚久、浅井章良
2. 発表標題 ADC を指向した STLC 誘導体を有する新規 linker-payload の設計と合成
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深井涼太、小郷尚久、山根正敬、三好奈央、浅井章良
2. 発表標題 がん細胞選択性を指向したシステイン誘導体プロドラッグのデザインと合成
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会（東京）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryota Fukai, Naohisa Ogo, Masayoshi Yamane, Nao Miyoshi, and Akira Asai
2. 発表標題 Structure-based design and evaluation of cysteine derivative prodrugs targeting cancer cells utilizing g-glutamyltransferase activity
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (ICPF2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森智哉、清水広介、成田雄大、阿形寿規、大塚和摩、小郷尚久、浅井章良、奥直人
2. 発表標題 がん治療を目指した Eg5 阻害剤封入リポソームの開発
3. 学会等名 日本薬学会第137年会（仙台）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学大学院薬学研究院 創薬探索センター <a href="https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~tansaku/index.html">https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~tansaku/index.html</a>
--

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