

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19317

研究課題名（和文）自ら感知し、効果を発揮するスマートドラッグの開発

研究課題名（英文）Development of smart drugs for the sensing and inhibition of target biomolecules

研究代表者

松尾 和哉（Matsuo, Kazuya）

京都工芸繊維大学・分子化学系・助教

研究者番号：90764952

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）：既存の薬剤の半数は、標的酵素と特異的に結合することで効果を発揮する酵素阻害剤である。しかし、正常な細胞や組織においても、少なからず標的酵素は発現しており、これを阻害することによって、多大な副作用が生じる。そこで、より高い精度で、標的酵素へと機能する薬剤の開発が急務の課題である。この課題を解決するため、標的酵素活性特異的に阻害剤を放出する分子システムを開発しており、また、光で標的部位特異的に機能させることができる薬剤も開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって得られた分子内転位反応を利用した阻害剤構築法によって、副作用を減弱できる機能性薬剤「スマートドラッグ」の新規デザイン法が確立され、創薬技術ならびに創薬戦略の向上・発展に貢献できる。また、光制御型ROCK阻害剤の開発およびその成果を通じて、全身毒性を大きく抑えた状態で、疾患部位特異的に光で作用させる次世代の光薬剤治療法（光薬理学）の発展にも大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The half of the drugs we clinically use nowadays are enzyme inhibitors which can exhibit their effects through the specific binding to the target enzymes. Since the target enzymes are considerably expressed even in normal cells and tissues, severe side effects can be induced due to inhibiting the enzymes. To solve this significant drawback, we have developed a molecular system to release the inhibitors depending on the activities of target enzymes based on the intramolecular reaction. Also, we have developed the photoswitchable drugs that can be controlled by light with high spatiotemporal resolution.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：分子内転位反応 スマートドラッグ

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

既存の薬剤の半数は、標的酵素と特異的に結合することで効果を発揮する酵素阻害剤である。1981年以來、本邦の死亡要因第一位である「癌」を治療するために使用される抗癌剤の中にも、DNAの複製や細胞分裂に関与する酵素を標的とした抗癌剤や、癌細胞で特徴的に機能亢進している酵素を特異的に阻害する分子標的型抗癌剤などが知られる。しかし、正常な細胞や組織においても、少なからず標的酵素は発現しており、これを阻害することによって、多大な副作用が発生し、患者のQOLや予後を大きく低下させる。

副作用に対する既存の方法論として、投与量を厳密に調節したり、ドラッグデリバリーシステムやプロドラッグ化による副作用の回避などが検討され、一定の効果が認められるものの、正常細胞を傷害することに起因する副作用を完全に無くすることはできないのが現状である。したがって、より高い精度で、癌細胞だけで機能する薬剤の開発が急務の課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、この課題を解決すべく、標的酵素を自ら感知し、効果を発揮する“スマートドラッグ”を開発する。「スマートドラッグ」とは、標的酵素を認識する前には、阻害剤ではないが、標的酵素と反応すると、阻害剤へと自発的に変換され、標的酵素を阻害する機能性分子である。スマートドラッグを用いることで、標的酵素の発現量が低い正常細胞では、生成する阻害剤が極めて低濃度であり、酵素を阻害しない。一方、標的酵素が高発現する癌細胞では、阻害剤濃度が高くなり、酵素を阻害できる。したがって、投与量を厳密に制御する必要がなく、懸念される副作用を大幅に低減できる。以上より、次世代創薬に資する革新的ドラッグコンセプトとして「スマートドラッグ」を提案することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

スマートドラッグの概念を実証するため、酵素基質と酵素阻害剤の前駆体を同一分子内に併せ持つ機能性分子を着想した。この分子は、標的酵素によって基質部位が変換することで、阻害剤前駆体が阻害剤へと自発的に変換され、標的酵素を阻害する。

具体的に、本手法のproof-of-principleを示すため、標的酵素をヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)に設定した。ヒストンのアセチル化はコアヒストンN末端領域に存在するLys残基のεアミノ基で起こり、クロマチン構造の調節を通して転写活性に影響を与える。HDACは、アセチル化Lysを加水分解する酵素で、発癌過程で生じる遺伝子発現異常の多くに関与するため、HDAC阻害剤は分子標的型抗癌剤として応用され、一定の臨床成果を挙げてきた。しかし、癌治療を革新するほどの成果は得られていないのが実情である。

既存の報告(Jung, M. *et al.* *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5235.)から、HDACの基質認識は比較的緩く、Ac-Lys(Ac)-NHPhなどの単純な化合物も基質となることが知られる。また、HDAC阻害剤の設計指針は既に多くの報告から確立しており、HDACの活性中心に存在するZn<sup>2+</sup>へ配位するzinc binding group (ZBG)と、疎水的なcap group、および、それらを繋ぐlinkerから構成される(Breslow, R. *et al.* *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 84.)

これらを組み合わせたのが、HDAC用スマートドラッグ1である(図1)。1は、HDACの基質となるアセチル化Lys部位を含み、HDACによって脱アセチル化されると、求核性の高いアミノ基が生成する。このアミノ基は、分子内芳香族求核置換反応によって電子不足な芳香族部位(NBD: ニトロベンゾオキサジアゾール)へと攻撃し、同時にZn<sup>2+</sup>のキレート部位となるヒドロキサム酸を放出する(実際、NBDとアミノ基を利用した分子内芳香族求核置換反応によってHDAC活性を検出できる蛍光プローブが開発された。Sun, H. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15596.)。以上から、HDACの基質がHDAC阻害剤へと自発的に変換されると期待した。

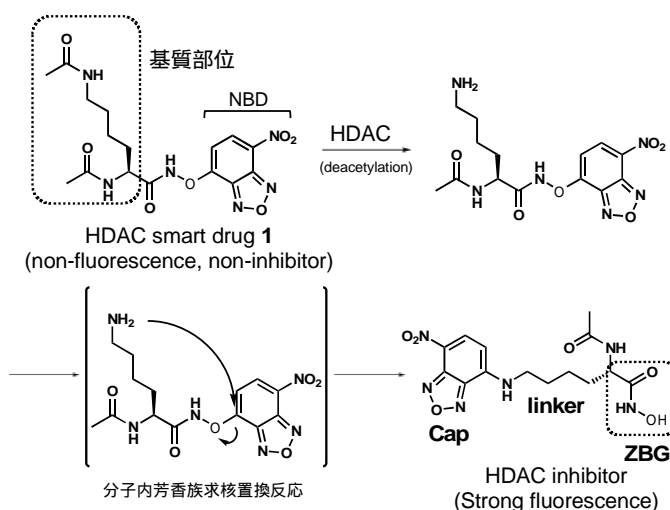


図1. HDACスマートドラッグ1の概略

#### 4. 研究成果

まず、スマートドラッグ1の合成を試みたが、ヒドロキサム酸部位の Lossen 転位が生じ、目的の化合物を与えなかった。そこで、新たに化合物2(図2a)を設計・合成した。ほぼ無蛍光の化合物2の脱アセチル化体を、水中で37度でインキュベートすると、わずかな発蛍光性が確認された。そこで、このサンプルをHPLCにより解析したところ、効率的な転位反応は確認できなかった。この要因として、フェノール結合性NBD色素の吸収極大が468 nmであり、脂肪族アルコールが連結したNBD色素の吸収極大が380 nmであることを考慮すると、ZBGとなるアミノフェノール部位とNBDの間で共役系が拡張されたと考えられ、安定性の向上によって、分子内転位反応が進行しにくいことが考えられた。そこで、現在、新たな分子内転位反応を駆使した分子設計を基盤とし、改良型スマートドラッグを開発中である。

また、スマートドラッグの別の方針として、光で可逆的に制御できる機能を付与することで、病変部位だけを狙って光刺激することで、効果的に機能する薬剤を開発できると期待される。ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase) は、Rho タンパク質により活性化されるキナーゼの1種であり、ミオシン軽鎖やLIMキナーゼのリン酸化を介して、多様な生命現象に関与する。その阻害剤は、現在、緑内障・高眼圧症の治療薬として応用されている。

このROCKの活性を、光で可逆的な *cis-trans* 異性化反応を誘起できる光制御型阻害剤3を設計・合成した(図3a)。

化合物3は、100% *trans* 体状態の光照射前において、385 nm 付近に  $\pi-\pi^*$  遷移に対応する吸収帯を示し、475 nm 付近に  $n-\pi^*$  遷移に対応した吸収帯を示した。405 nm の光照射時には、94% *cis* 体 (6% *trans* 体) を生成し、525 nm の光照射時には、83% *trans* 体 (17% *cis* 体) を生成することが明らかとなった。

また、ROCK に対する阻害活性をキナーゼアッセイにより検討した結果、光照射前には  $IC_{50} = 19 \mu M$ 、525 nm の光照射時には  $IC_{50} = 34 \mu M$  であったのに対し、405 nm の光照射時には阻害効果大きく減弱し、 $IC_{50} = 238 \mu M$  となったことから、*trans* リッチな条件と *cis* 体リッチな条件では、10倍程度の活性の差が確認された。

Balb 3T3 細胞を血清飢餓状態にし、ROCK 活性依存的に構築されるアクチンストレスファイバーを阻害できるかを蛍光イメージングによって検討した(図3b)。3の存在下、*trans* 体リッチな条件(光照射前および525 nm 光照射時)では、細胞内のROCK活性が阻害され、ファロイジンローダミンで染色されるアクチンストレスファイバー由来の繊維状構造体が消失した。これに対し、*cis* 体リッチな条件(405 nm の光照射時)には、アクチンファイバーが維持されていた。これらから、3が細胞系で機能する光制御型ROCK阻害剤であることが確認できた。

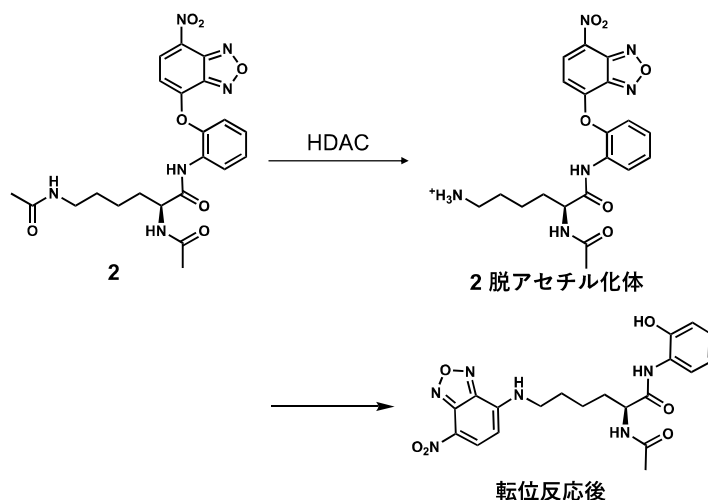


図2. 化合物2の化学構造とその反応生成物

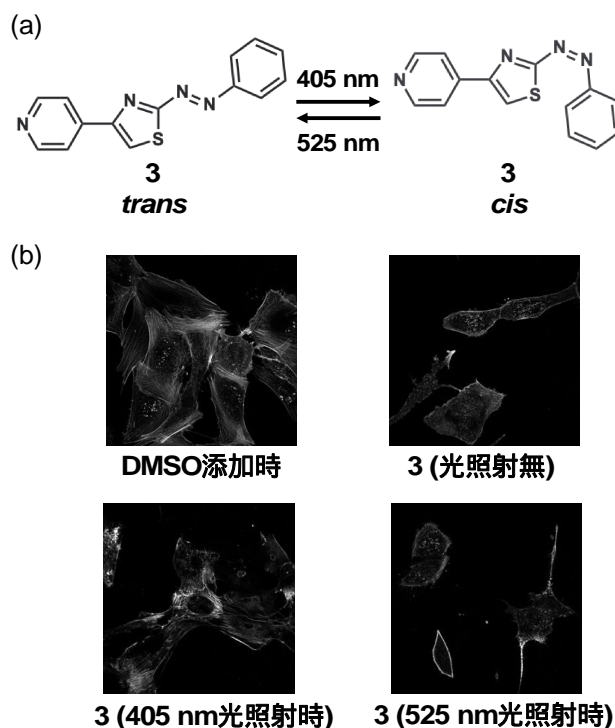


図3. (a) 光制御型ROCK阻害剤3とその光応答性、(b) 3による細胞内ROCK活性の光制御によるアクチンストレスファイバーの操作

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Kazuya Matsuo, Sampreeth Thayyil, Mitsuyasu Kawaguchi, Hidehiko Nakagawa and Nobuyuki Tamaoki	4. 巻 57
2. 論文標題 A visible light-controllable Rho kinase inhibitor based on a photochromic phenylazothiazole	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12500-12503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1CC04905D	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾和哉、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 アクトミオシン系を可視光で制御できるROCK阻害剤の開発
3. 学会等名 第12回4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾和哉
2. 発表標題 細胞機能を操作する光化学技術の開発
3. 学会等名 第27回光科学若手研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------