

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590154

研究課題名(和文) 抗癌剤としての非塩基性アミノ酸 P1 部を有する新規プラスミン阻害剤の開発

研究課題名(英文) Novel type of plasmin inhibitors: providing insight into P1 moiety

研究代表者

手納 直規 (Teno, Naoki)

広島国際大学・医療栄養学部・教授

研究者番号：00535586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：凝固線溶系のセリンプロテアーゼであるプラスミンは、MMPの開始因子としてがんの形成に関わっていることが知られている。従ってプラスミン阻害剤は、新たな作用機序を有する抗がん剤として機能することが推測される。そのため、プラスミンの合成基質の一次配列を基にプラスミン阻害剤をデザインした。その構造的特徴は、warheadとしてニトリル基を持ちことである。また、非ペプチド性阻害剤として、pyrrolopyrimidine を scaffold とし、それを分子の中心におき活性中心のサブサイト(ヒダントインを含むP4部、warheadを含むP1部)と相互作用するために必要な官能基を配置した。

研究成果の概要(英文)：Plasmin is suggested to be involved in physiological processes that are linked to the risk of carcinoma formation. Plasmin inhibitors could be perceived as a promising new principle in the treatment of diseases triggered by plasmin. On the basis of the peptidic sequence derived from the synthetic plasmin substrate, the peptidic inhibitor complexed with plasmin reveal that the P2 residue makes favorable contacts with the open binding pocket comprising the S2 and S3 subsites of plasmin. Otherwise, as the non-peptidic inhibitors, a novel chemotype, pyrrolopyrimidine scaffold possessing two motifs, a hydantoin-containing P4 moiety and a warhead-containing P1 moiety, is uncovered. A unique feature of the new line of the plasmin inhibitors is that the interaction between the plasmin inhibitors and key subsites in plasmin can be controlled by a spacer like hydantoin. The application of the novel chemotype provides further evidence on the importance of hydantoin as the spacer.

研究分野：創薬化学

キーワード：プラスミン阻害剤 ピロロピリミジン ヒダントイン scaffold Warhead

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、線溶系酵素として知られているプラスミンによる MMP 活性化が及ぼす腫瘍増殖作用に注目した。プラスミンを阻害し、その下流の MMP 活性化の阻害は腫瘍増殖抑制に繋がり、全く新規の作用機序を有する抗がん剤に繋がると考えられる。近年、血液がんにはプラスミンにより活性化された MMP の一種である MMP-9 が腫瘍増殖に関わっており、動物実験ではあるがプラスミン阻害剤 (YO-2) が MMP-9 を抑制し、それが腫瘍抑制に繋がっていると報告された。この報告は、プラスミン阻害剤を抗がん剤として利用する治療法は、既存のがん治療アプローチとして差別化でき、がん治療へのアプローチとして幅が広がり、加えて血液がんが存在するプラスミンによる MMP-9 の活性化機構のみを抑制するため、新規の分子標的薬という位置づけも可能であると示唆される。既存のプラスミン阻害剤は、トラネキサム酸やペプチド性の YO-2 が知られている。最近、warhead としてアルデヒド基を有するペプチド性阻害剤や環状マクロライドを有するペプチド性阻害剤が報告されている。しかし、両者はペプチド性であるため臨床応用に不利な一面を有し、前者の warhead としてのアルデヒド基は、選択性の無さが容易に予想される。

2. 研究の目的

プラスミンは凝固線溶系に関わるセリンプロテアーゼである。プラスミンのもう一つの生理作用としてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化がある。活性化された MMP が腫瘍増殖作用を有することは古くから知られている。従って、現在まで様々な MMP 阻害剤が抗がん剤として臨床研究されたが、それら阻害剤の選択性の低さが起因する有害作用によりいずれも良好な結果が得られていない。

一般にこれまで開発されていた抗がん剤は、毒物に近い一面を持ち甚だしいクオリティオブライフ (QOL) の低下を示していた。それが欧米では、QOL を指標化し、下回れば保険適応を見送っている。QOL を維持し、保険適応を容易にするには、副作用や有害作用を軽減した薬剤が求められ、その潮流が分子標的薬の開発を後押し、分子標的薬としての抗がん剤が市場を席卷してきた。しかしながら分子標的薬の限界も表面化しつつあり、抗がん剤の奏効率という指標自体に今では疑問点も感じられる。このような状況下、抗がん剤に留まらず各種疾患領域の薬剤開発には違った作用機序を有する薬剤開発が望まれている。

そのため 毒性に起因すると報告されている P1 部の塩基性基の置換を検討する。既存のプラスミン阻害剤とは違う新規骨格を持つプラスミン阻害剤を開発し、市場に供給することを最終目的として着手した。従って、

がん疾患治療へのアプローチの幅を広げることになり、QOL 向上へ繋がり社会構造の変化に伴ったがん治療の一助となる。一方、新規プラスミン阻害剤の開発に伴い、プラスミンの活性中心周辺の各ポケット、S2、S3 や S4 の立体地勢も明らかにすることができる。

3. 研究の方法

ペプチド性基質から阻害剤へ

ペプチド性基質として報告のある D-Ile-Phe-Lys-pNA の配列を利用し pNA 部を warhead としてニトリル基に置換し阻害剤として機能することを確認した。Warhead を有するペプチド性阻害剤の各 subsite での志向は基質から誘導した阻害剤である D-Ile-Phe-Lys-CN の骨格を基に進めた。この Lys を塩基性を持たない様々なアミノ酸残基や類縁体によって置換した。更にプラスミンの広い S2、S3 サイトを効率よく埋めるため P3 と P2 残基に新規のアミノ酸または非アミノ酸残基を導入し新規なペプチド性阻害剤の骨格並びに構造活性相関を確立していく。

非ペプチド性阻害剤

非ペプチド性阻害剤でも非塩基性 P1 部の導入を検討すべく阻害剤の基本骨格の検討を行った。合成的に官能基 (P1 ~ P4 部) の導入が可能な複素環化合物を数種選択した。それらの酵素・化合物の複合体を CADD により視覚化し、ピロロピリミジンが scaffold の候補となった。図 1 に示すようにピロロピリミジンを scaffold としてプラスミン阻害剤の中心に置き、そこからプラスミンの活性中心

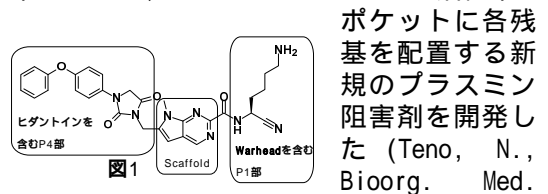


図 1

ポケットに各残基を配置する新規のプラスミン阻害剤を開発した (Teno, N., Bioorg. Med. Chem., 2014, 22, 2339-2352.)。

この報告を発展させることによって、(1) 未だ詳細な報告のないプラスミンの S4 ポケットの特異性を明らかにできる。(2) P1 部、warhead と P4 部の 3 点で酵素との大半の相互作用を行う全く新規のプラスミン阻害剤へ導く事が可能である。ヒダントインの先に導入する残基の性質によって分子全体の薬物動態を変化させるべく、その基礎的データを得る事が出来る。

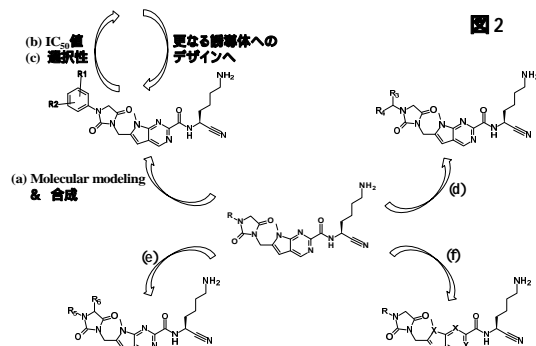


図 2

上記に示した結果を得るべく、(a) 図 1 に示した阻害剤の骨格を基に図 2 に示す R に様々な置換基 (芳香族系化合物) を導入し、先ず computer assisted drug design (CADD) を利用し酵素との相互作用を可視化し、相互作用の観点から優先順位をつけ、その上位から合成を行う。

(b) 合成した阻害剤を *in vitro* でプラスミンに対する阻害活性を測定し、その阻害活性を IC₅₀ 値で判定し、その値がシングル μM または nM レベルの阻害活性を持った化合物を探る。ここでの測定結果は、同領域の次の化合物デザインに活かしていく。

(c) 選択性に関して図 1 で示した構造ならびにその誘導体は、プラスミンと一次構造が酷似する、ウロキナーゼに対する阻害活性は示さなかった。しかし、両酵素に関しても IC₅₀ 値をプラスミンの阻害活性と同時に測定し、それぞれの IC₅₀ 値を比較し、常に 200 倍以上の選択性を得るための構造要因を探索する。(b)、(c) で得られた情報を基に更なる誘導体デザインを行う。

(d) 上記(a)~(c)と同時に R に脂肪族側鎖を導入し酵素との相互作用様式を CADD により可視化し、合成した後、阻害活性ならびに選択性を検討し、新たな範疇のプラスミン阻害剤へと導く。

(e) ここまで得られたプラスミンとの相互作用に有用な R5 を固定し、更なるプラスミンとの相互作用部位を探索する。ヒダントイン上の R6 は、キラルなアミノ酸を利用し誘導体のデザインと合成が可能であるため、その目的を達成するに都合の良い位置である。得られた誘導体は、上記と同様に阻害活性と選択性を検討する。

(f) 阻害剤の多様性を探るため、ピロロピリミジンの生物学的等価体としての複素環を導入し阻害活性と選択性を検討する。

(g) 高活性・高選択性を示す阻害剤は、薬物動態を測定し *in vivo* モデルへの候補化合物を探る。

4. 研究成果

ペプチド性基質から阻害剤へ

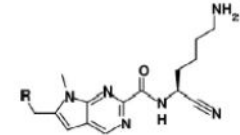
ペプチド性プラスミン阻害剤のデザインをしていく過程で、一つの特徴としてニトリル基が warhead として機能することがわかった。この機能を利用し、P1 部の検討を行った。プラスミン阻害剤の P1 部は塩基性官能基を有するアミノ酸やその類縁体が多く、それは認識機構に重要である一方で、膜の透過性やその官能基がもたらす有害作用の引き金にもなる。そのため酵素の対応部である S1 サイトの構成基から推察する限り P1 部が必ずしも塩基性である必要はないと考え、塩基性以外のアミノ酸類縁体の導入を検討した。しかしながら、CADD のモデリングから S1 部入口の大きさや角度等に障害があり、非塩基性 P1 部を持つペプチド性プラスミン阻害剤には

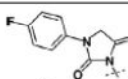
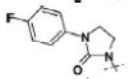
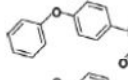
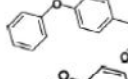
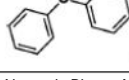
至っていない。

非ペプチド性阻害剤

これと同時に非ペプチド性プラスミン阻害剤の開発では、ある中心骨格から適材適所に酵素のサブサイトと相互作用する官能基を持ち得る複素環 scaffold の検討に取りかかった。その結果、scaffold としてピロロピリミジン骨格上にスペーサーとしてヒダントインを持つ P4 部とニトリル warhead を有する P1 部からなる新規プラスミン阻害剤を開発した (BMC, 22, 2339-2352, 2014 より引用, Table 4 の化合物 1n)。また、配座を固定し自由度の少ない化合物デザインに結びつけるため、scaffold をピロロピリミジンからベンゾイミダゾールに変更した。これら両 scaffold を持つそれぞれの化合物は同等の阻害活性を示し、CADD による酵素-阻害剤複合体の結果から両化合物とも同様のバインディングモードを示すことが分かった。このことから両 scaffold はプラスミン阻害剤中で生物学的等価体として機能することが分かった。これらの知見は、ベンゾイミダゾール部構築しながら配座を固定し自由度の少ない化合物デザインに結び付けられ成果も得られつつある。

Table 4
Inhibition of plasmin, plasma kallikrein and urokinase by 1b, 1n and 1u-1w



Compounds	R	IC ₅₀ (μM)		
		Plasmin	Plasma kallikrein	Urokinase
1b		130	740	>1000
1u		510	>1000	>1000
1n		51	>1000	>400
1v		>250	>1000	>200
1w		960	>1000	>1000

Teno, N., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 2339-2352, 2014. より引用

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Teno, N.; Otsubo, T.; Gohda, K.; Wanaka, K.; Sueda, T.; Ikeda, K.; Hijikata-Okunomiya, A.; Tsuda, Y. Synthesis and evaluation of peptidic plasmin inhibitors with nitrile as warhead. *J. Peptide Sci.*, 査読有, 18,

620-625, (2012).
DOI 10.1002/psc.2442
Sueda, T.; Kawada, A.; Urashi, Y.; Teno, N. Ag and Au-Catalyzed addition of alcohols to ynimides: β -regioselective carbonylation and production of oxazoles. *Org. Lett.*, 査読有, 15, 1560-1563, (2013).
DOI 10.1021/ol400338x
Gohda, K.; Fujimori, K.; Teno, N.; Wanaka, K.; Tsuda, Y. Synthetic substrates specific to activated plasmin can monitor the enzymatic functional status in situ in breast cancer cells. *Chem. Biol. Drug Des.*, 査読有, **83**, 52-57, (2014).
DOI 10.1111/cbdd.12232
Teno, N.; Gohda, K.; Wanaka, K.; Tsuda, Y.; Sueda, T.; Yamashita, Y.; Otsubo, T. Pyrrolopyrimidine-inhibitors with hydantoin moiety as spacer can explore P4/S4 interaction on plasmin. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, **22**, 2339-2352, (2014).
DOI 10.1016/j.bmc.2014.02.002
Teno, N.; Gohda, K.; Wanaka, K.; Tsuda, Y.; Akagawa, M.; Akiduki, E.; Araki, M.; Masuda, A.; Otsubo, T.; Yamashita, Y. Novel type of plasmin inhibitors: providing insight into P4 moiety and alternative scaffold to pyrrolopyrimidine. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, *in press*.

〔学会発表〕(計 1件)

山下ユキコ, 合田圭吾, 大坪忠宗, 和中敬子, 津田裕子, 手納直規, Pyrrolopyrimidine scaffold 上に P1, P4 部を有するプラスミン阻害剤のデザインと合成, 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム(神戸) 要旨集 p132, 2014 年 11 月 27 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
手納 直規 (TENO NAOKI)
広島国際大学 医療栄養学部 教授

研究者番号: 00535586

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: