

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15139

研究課題名(和文)GPCR二量体認識ユニットを活用したケミカルバイオロジー研究

研究課題名(英文)Chemical Biology Researches Using Recognition Units for GPCR Dimers

研究代表者

玉村 啓和 (TAMAMURA, Hirokazu)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：80217182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：以前、我々はGPCRのひとつCXCR4に関して、リンカーとして強固なヘリックス構造をとるポリプロリン鎖を用いることでCXCR4の二量体構造を高い親和性を持って認識する2価型リガンドを開発し、二量体状態の特異的認識に成功した。本研究では、GPCRホモ二量体を認識する同種2価型リガンドだけでなく、ポリプロリン鎖の両端にも異なる官能基を導入したものを合成し、異種2価型リガンドを創製する方法を確立した。さらに、GPCR二量体を特異的に認識する医薬品の創出への展開を行った。そして、任意のGPCRの二量体構造認識プローブをドラッグシャトル等医薬学的に展開する一般的な学術基盤を確立することを目指した。

研究成果の概要(英文)：Interaction of CXCR4 with its endogenous ligand, stromal-cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12, induces various physiological functions involving chemotaxis. Bivalent ligands with a polyproline helix bearing a cyclic pentapeptide, FC131, were previously shown to have higher binding affinities for CXCR4 than the corresponding monovalent ligands. Bivalent ligands based on a 14-mer peptide T140 derivative with polyproline linkers have been designed and synthesized. Heterological bivalent ligands recognizing heterological GPCR dimers as well as homological bivalent ligands recognizing homological dimers have been developed in a similar way. In addition, a methodology to develop drug-shuttle compounds using recognition probes for GPCR dimers has been established. The activity of these peptides as well as the effect of bivalency of the ligand on GPCR binding has been assessed. The effective functions of bivalent ligands indicates the therapeutic potential.

研究分野：創薬化学

キーワード：GPCR二量体 2価型リガンド CXCR4 プローブ がん

1. 研究開始当初の背景

現在のプロテオーム・ゲノム創薬研究において、Gタンパク質共役型受容体(G-protein coupled receptor; GPCR)は中心的な役割を示す重要な受容体ファミリーであり、現存する医薬品の30%以上がさまざまなGPCRを標的としている。このGPCRに対して詳細な構造や機能の解明が望まれているが、膜型受容体であることからX線結晶構造解析が困難である。最近いくつかGPCRのX線結晶構造が報告されているが、細胞内領域を人工的に改変した誘導体を使用していることが多いので、必ずしも天然の状態を反映していない。そのため、GPCRを解析するためのプローブは、生命科学研究において有用である。また、近年になって、GPCRの二量体化がシグナル伝達において重要であり、さらに、病態の進行と密接に関わることが示唆されている(Wang J., et al., *Mol. Cancer Ther.*, 5, 2474, 2006)。よって、GPCRの二量体を検出できるプローブは、非常に有用であると考えられる。GPCRの二量体に2価型で結合するリガンドは各リガンドの結合による相乗効果によって高い親和性と特異性が得られることが知られていたが、これまではリガンド間をつなぐリンカーには生体への親和性の高いポリエチレングリコール(PEG)や芳香族を含む炭素鎖が用いられており、それらは構造的な柔軟性が大きいため高い結合親和性や特異性の実現は困難であった(Hruby V. J., et al., *Bioconjugate Chem.*, 18, 1101, 2007)。

2. 研究の目的

本研究では、任意のGPCRの二量体構造認識プローブを医薬学的に展開する一般的な学術基盤を確立することを目指す。我々は以前からGPCRのひとつであるケモカインレセプターCXCR4の二量体構造を高い親和性を持って認識する2価型リガンドを開発してきた。2個のリガンド間を結ぶリンカーは強固なヘリックス構造をとるポリプロリン鎖を用いており、このポリプロリン鎖の両端にクロロアセチル基を導入し、リガンドD-Cys-FC131のチオール基と選択的に反応させて、2価型リガンドを合成していた。すなわち、ホモ二量体を認識する2価型リガンドを合成する場合は、リガンド中の同じ官能基との化学選択的反応を用いればいいが、ヘテロ二量体を認識する異種2価型リガンドを合成する場合は、異なる官能基との化学選択的反応を2種用いる必要がある。従って、ポリプロリン鎖の両端にも異なる官能基を導入したものを合成し、異種リガンドのそれぞれの官能基と化学選択的反応により縮合し、異種2価型リガンドを創製する。このようにして、本研究ではGPCRの二量体構造を認識するプローブの開発、実用化を基盤とした研究を行う。さらに、GPCR二量体認識ユニットに他の医薬品を導入し、GPCR発現細胞に選択的に医薬品をターゲティングするドラッグシャトルへの展

開をはかる。

3. 研究の方法

(1) GPCRホモ二量体を認識するプローブのためのリンカーの合成

以前我々が創製した2価結合型CXCR4リガンドは、環状5残基ペプチドFC131誘導体D-Cys-FC131を2個用いて種々の長さのポリプロリンやポリプロリンPEGリンカーで架橋した2価型化合物である。ポリプロリンやポリプロリンPEGリンカーの両端にはクロロアセチル基を導入しており、これがD-Cys-FC131のチオール基と選択的に反応して、2価型化合物を合成している。CXCR4ホモ二量体を認識する場合は、ポリプロリンリンカー鎖のPro数 $n = 20$ のとき、あるいはポリプロリンPEGリンカー鎖のPro数 $m = 12$ のとき、親和性が最大になった(Tanaka T., et al., *J. Am. Chem. Soc. (Commun.)*, 132, 15899, 2010)。そこで、一般のGPCRホモ二量体を認識するプローブを創製する場合も、Pro数15-25個程度のポリプロリンリンカー鎖(あるいは、Pro数7-17個程度のポリプロリンPEGリンカー鎖)を調製すれば、リガンドを2個結合させて、同種2価型化合物を合成することができる。その際、リガンド側にある官能基の種類により、ポリプロリン(ポリプロリンPEG)リンカー鎖の両端にも選択的に反応する官能基を導入したものを合成する。一般のGPCRリガンドは、いろいろな官能基を含んでいる、あるいは後付で導入できるので、チオール基と反応するクロロアセチル基以外に、オキシアミノ基と反応するメチルケトン基、エチニル基と反応するアジド基等をポリプロリン(ポリプロリンPEG)リンカー鎖の両端に導入した、上記の長さの範囲のリンカーをデザインする。このようにして、種々のGPCRリガンドを2個結合できるホモ二量体認識プローブ創製用のリンカーをいくつか合成する。

(2) GPCRヘテロ二量体を認識するプローブのためのリンカーの合成

研究の目的で述べたようにGPCRはホモ二量体だけでなくヘテロ二量体を形成することにより、生理現象や病態の進行に密接に関与している。そこで、一般のGPCRヘテロ二量体を認識するプローブを創製することを考え、同様に上記の長さの範囲のポリプロリン(ポリプロリンPEG)リンカー鎖の両端にクロロアセチル基、メチルケトン基、アジド基等別々の官能基を導入する。このようにして、種々の異種のGPCRリガンドを2個結合できるヘテロ二量体認識プローブ創製用のリンカーをいくつか合成する。

(3) GPCR二量体認識ドラッグシャトルの創製のためのドラッグ付加用リンカーの合成

GPCRホモ・ヘテロ二量体認識ユニットのリンカー部位に他の医薬品を導入できるように、リンカー中央部付近のプロリン残基の側鎖にドラッグシャトル用リンカー、およびその先端に他の医薬品を縮合するための官能基を導入する。ドラッグシャトル用リンカーとしては、長さを固定する必要がないので、

PEG リンカー等フレキシブルなものを採用し、3種類くらいの長さのものを用意する。また、導入する官能基は二量体認識ユニットや他の医薬品の構造に含まれていない orthogonal な官能基を採用する。

4. 研究成果

現在の創薬・ケミカルバイオロジー研究において、7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体(G-protein coupled receptor; GPCR)は中心的な役割をはたす受容体ファミリーであり、医薬品の30%以上がさまざまなGPCRを標的としている。近年、GPCRの二量体化がシグナル伝達において重要であり、病態の進行と密接に関わるこ とが示唆されている。よって、GPCRの二量体を検出できるプローブは、非常に有用であると考えられる。以前、我々はGPCRのひとつであるケモカインレセプターCXCR4に関して、リンカーとして強固なヘリックス構造をとるポリプロリン鎖を用いることでCXCR4の二量体構造を高い親和性を持って認識する2価型リガンドを開発した。このポリプロリン鎖の両端にクロロアセチル基を導入し、リガンド中に含まれるD-Cys-FC131のチオール基と選択的に反応させて、2価型リガンドを合成した。結果的に結合親和性の向上した2価結合型リガンドを構築し、二量体状態の特異的認識に成功した。そこで、本研究では2価型でGPCR二量体に結合するプローブの創製研究をさらに推し進めた。ホモ二量体を認識する2価型リガンドを合成する場合は、リンカーであるポリプロリン鎖の末端の2個の官能基とリガンド中の官能基の同じ組み合わせで1種類の化学選択的反応を用いればいいが、ヘテロ二量体を認識する異種2価型リガンドを合成する場合は、異なる官能基の組み合わせの2種類化学選択的反応を用いればいい。従って、ポリプロリン鎖の両端にも異なる官能基を導入したものを合成し、異種リガンドのそれぞれの官能基と化学選択的反応により縮合し、異種2価型リガンドを創製する方法を確立した。GPCRホモ二量体を認識するプローブを創製する場合、Pro数15-25個程度のポリプロリンリンカー鎖を調製し、リガンドを2個結合させて、同種2価型化合物を合成することができた。その際、リガンド側にある官能基の種類により、ポリプロリンリンカー鎖の両端にも選択的に反応する官能基を導入したものを合成している。GPCRヘテロ二量体を認識するプローブを創製する場合、上記の長さの範囲のポリプロリンリンカー鎖の両端にクロロアセチル基、メチルケトン基、アジド基等別々の官能基を導入し、種々の異種のGPCRリガンドを2個結合できるヘテロ二量体認識プローブ創製用のリンカーをいくつか合成している。さらに、GPCR二量体の特異的に認識する医薬品の創出への展開を行った。そして、任意のGPCRの二量体構造認識プローブをドラッグシャトル等医薬学的

に展開する一般的な学術基盤を確立することを目指した。具体的には、GPCR二量体認識ユニットに他の医薬品を導入し、GPCR発現細胞に選択的に医薬品をターゲティングするドラッグシャトルの創製を行った。本研究成果により、GPCR二量体プローブ、GPCRをターゲティングするドラッグシャトルの創製の方法論の確立が期待でき、GPCR二量体プローブによりがん細胞等の特異的な可視化システムを創出することができ、ドラッグシャトルにより有用な薬物送達システムが確立できると期待される。したがって、本研究は中分子サイズの分子標的創薬になりうる方法論の開発につながると思われる。このようにして、本研究ではGPCRの二量体構造を認識するプローブの開発、実用化を基盤とした研究を行った。

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10件)

- Takuya Kobayakawa, Yudai Matsuzaki, Kentaro Hozumi, Wataru Nomura, Motoyoshi Nomizu & Hirokazu Tamamura, Synthesis of a Chloroalkene Dipeptide Isostere-Containing Peptidomimetic and Its Biological Application. ACS Med. Chem. Lett., 査読有, 9巻, 2018, 6-10, DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00234
- Nami Ohashi, Ryosuke Kobayashi, Wataru Nomura, Takuya Kobayakawa, Agnes Czikora, Brienna K Herold, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg & Hirokazu Tamamura, Synthesis and Evaluation of Dimeric Derivatives of Diacylglycerol-Lactones as Protein Kinase C Ligands. Bioconjugate Chem., 査読有, 28巻, 2017, 2135-2144, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00299
- Takuya Kobayakawa & Hirokazu Tamamura, Stereoselective Synthesis of Xaa-Yaa Type (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres via Efficient Utilization of Organocopper Reagents Mediated Allylic Alkylation. Tetrahedron, 査読有, 73巻, 2017, 4464-4471, DOI: 10.1016/j.tet.2017.06.003
- Hikaru Takano, Tetsuo Narumi, Wataru Nomura & Hirokazu Tamamura, Microwave-Assisted Synthesis of Azacoumarin Fluorophores and the Fluorescence Characterization. J. Org. Chem., 査読有, 82巻, 2017, 2739-2744, DOI:

10.1021/acs.joc.6b02656
Tomohiro Tanaka, Toru Aoki, Wataru Nomura & Hirokazu Tamamura, Bivalent 14-mer Peptide Ligands of CXCR4 with Polyproline Linkers with Anti-Chemotactic Activity against Jurkat Cells. *J. Pept. Sci.*, 査読有, 23 巻, 2017, 574-580, DOI: 10.1002/psc.2946

Kazuya Kobayashi, Takaaki Mizuguchi, Yasunao Hattori, Naho Ohara, Ryunosuke Ninomiya, Mika Iida, Honami Ooe, Yukako Yamazaki, Minami Takata, Hirokazu Tamamura & Kenichi Akaji, Effects of Replacement and Addition of an Amino Acid Contained in a Cyclic Peptide Corresponding to a -Hairpin Loop Sequence of Human EGF Receptor. *J. Pept. Sci.*, 査読有, 23 巻, 2017, 581-586, DOI: 10.1002/psc.3004

Wataru Nomura, Haruo Aikawa, Shohei Taketomi, Miho Tanabe, Takaaki Mizuguchi & Hirokazu Tamamura, Exploration of Labeling of Near Infrared Dyes on the Polyproline Linker for Bivalent-Type CXCR4 Ligands. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 23 巻, 2016, 6967-6973, DOI: 10.1016/j.bmc.2015.09.040

Hikaru Takano, Tetsuo, Narumi, Wataru Nomura, Toshiaki Furuta & Hirokazu Tamamura, Utilization of the Heavy Atom Effect for the Development of a Photosensitive 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Group. *Org. Lett.*, 査読有, 17 巻, 2016, 5372-5375, DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02720

Kenichi Hiramatsu & Hirokazu Tamamura, A Mild Method for the Direct Fluorination of Pyrroles by Using a Lipophilic Anionic Phase-Transfer Catalyst. *Eur. J. Org. Chem.*, 査読有, 2016 巻, 2016, 3491-3494, DOI: 10.1002/ejoc.201600570

[学会発表](計 28 件)

玉村啓和: 2018 年 3 月 7 日、第 61 回ヒューマンサイエンス・バイオインターフェース バイオ技術移転のための交流の場、東京、「ペプチドミメティックを基盤とした中分子創薬」

Tamamura H.: Oct 17, 2017, 12th Australian Peptide Conference 2017, Noosa, Australia, "Synthesis of chloroalkene dipeptide isosteres as peptidomimetics and their biological application"

玉村啓和: 2017 年 6 月 14 日、平成 29 年度(春季)有機合成化学講習会、東京、「ペプチドミメティックを基盤とした中分子創薬とケミカルバイオロジー」

玉村啓和: 2017 年 1 月 13 日、システム薬学研究機構「第 8 回新たな創薬パラダイムの創出」、東京、「ペプチドミメティックを活用した中分子創薬の研究」

Tamamura H.: Dec 8-9, 2016, the 2nd Peptides and Proteins Symposium Singapore, Singapore, Singapore, "Mid-size Drugs: Peptide-lead Anti-HIV Agents"

玉村啓和: 2016 年 11 月 25 日、第 30 回日本エイズ学会学術集会シンポジウム「HIV envelope を標的とした感染防御」、鹿児島、「HIV envelope の構造変化をターゲットとした阻害剤の創製」

Tamamura H.: Jun 24-25, 2016, the 20th Korean Peptide Protein Society Symposium, Yangyang, Korea, "Mid-Size Drugs: HIV Fusion Inhibitors Based on the C34 Dimer/Trimer Derived from gp41"

[図書](計 2 件)

小早川拓也、玉村啓和:「第 II 編 第 3 章 ペプチドミメティック(ジペプチドイソスター)の合成と応用」中分子医薬開発に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成・高機能化技術「監修 千葉一裕」(株式会社 シーエムシー出版 東京)、36-48、2018 年 2 月 28 日

玉村啓和、大橋南美:「第 2 章 ペプチドミメティックの開発と中分子創薬研究への応用 第 1 節「ペプチドミメティックを活用した中分子創薬研究」」ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術(株式会社 技術情報協会 東京) 85-96、2017 年 12 月 27 日

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉村 啓和 (TAMAMURA, Hirokazu)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号: 80217182

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

野村 渉 (NOMURA, Wataru)

水口 貴章 (MIZUGUCHI, Takaaki)

大橋 南美 (OHASHI, Nami)