

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2006～2008  
課題番号：18350090  
研究課題名（和文） タンパク立体構造に基づくチロシンキナーゼ阻害剤の創薬研究  
研究課題名（英文） Development of Tyrosine Kinase Inhibitors Based on the Structures of Target Protein  
研究代表者  
中村浩之（NAKAMURA HIROYUKI）  
学習院大学・理学部・教授  
研究者番号：30274434

## 研究成果の概要：

標的のチロシンキナーゼ活性部位のタンパクの立体構造に基づくドラッグデザインを、コンピューターシミュレーション法を駆使して、インデノピラゾール誘導体の内皮細胞増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害活性、ならびに de Novo 分子設計により新しい内皮細胞増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤のリード化合物の探索に成功した。さらに、このリード化合物の誘導体から低酸素誘導因子阻害活性を有する化合物を見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ポストゲノム創薬

## 1. 研究開始当初の背景

2003 年にヒトゲノムの解析が終わり、いよいよポストゲノムの時代に入った。様々な疾病に関するメカニズムが分子レベルで解明されつつあり、それらを分子標的とした創薬研究が活発になってきている。Iressa (2002 年日本で認可) や Tarceva (2004 年欧米で認可) が、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤として開発された。しかし最近の研究では、変異型 EGFR チロシンキナーゼを持つ患者へは効果があるが、そうでない患者へはあまり効果がないことが明らかとなってきた。これを克服

するために近年 irreversible な阻害剤の開発が進められている (CI 1033: Pfizer, Phase II)。一方、VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤として、フタラジン誘導体 PTK787 およびキナゾリン誘導体 ZD6474 などが報告されているが、まだ認可されている VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤はない。本研究では、これまで知られていない新しい骨格であるベンゾフロピラジンを新たなリード骨格とした阻害剤を開発するとともに、その新しい骨格を創薬分野に提供するものである

## 2. 研究の目的

本課題研究では、がん治療の分子標的として注目されているチロシンキナーゼを標的とした創薬研究を行い、有機合成を基軸として分子標的治療薬の開発に重要な

1. 標的タンパクの構造に基づく分子設計
2. 有機合成
3. タンパクレベル・細胞レベルでの生物活性評価

の3つの過程の確立を行い、疾患に関わるタンパクの立体構造に基づく分子標的治療薬物設計によるリード化合物を探索し、アカデミアからの新薬を開発することを大きな研究目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1、EGFR チロシンキナーゼの立体構造に基づく阻害分子の設計と合成

化合物ライブラリー50万個から、EGFR チロシンキナーゼに対するバーチャルスクリーニングを行い、100個の化合物を絞り込んだ。それら100個の化合物を更により詳細にドッキングシミュレーションを行い、ドッキングスコア関数である、LigScore2, PLP1, PLP2, Ludi3, PMF, Jain を用いてコンセンサス法により、信頼性の高いドッキングポーズを選び出した。キナーゼ結合部位との相互作用から目視により選んだインデノピラゾール骨格を基にした EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の合成を行った。

#### 2、de novo 分子設計法を駆使した VEGFR チロシンキナーゼ阻害分子の設計と合成

既に立体構造が報告されている VEGFR2 チロシンキナーゼ (KDR) の立体構造に基づく de Novo 分子設計を行い、新しい阻害剤合成を行った。

#### 3、チロシンキナーゼアッセイ法の確立

市販の EGFR、HER2、FLT1、KDR を用いて、ELISA 法によるチロシンキナーゼアッセイ系を立ち上げた。マルチラベルマイクロプレートリーダーを用いて行った。

### 4. 研究成果

(1) インデノピラゾール誘導体が内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) チロシンキナーゼに対して高い阻害活性を有することを見出した。VEGFR チロシンキナーゼは、がんの血管新生に関わる重要なチロシンキナーゼであることから、がん分子標的として注目されている。細胞増殖阻害活性も高く、この作用機序は主にサイクリン依存キナーゼ阻害によるものであることが分かった。

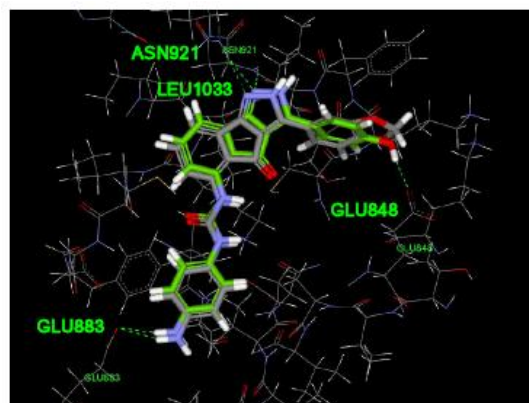
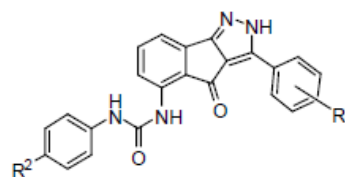


図 1. インデノピラゾールの構造と VEGFR チロシンキナーゼ結合様式

(2) de Novo 分子設計を行い、新しい阻害剤合成を行ったところ、ベンジルアニリン骨格を有する化合物で活性が見られ、中でも  $0.5 \mu\text{M}$  でチロシンキナーゼを 50% 阻害する化合物を新規に見出すことに成功した。さらに、低酸素状態で活性化される因子である HIF-1 $\alpha$  に着目しスクリーニングを行ったところ、これらの合成した化合物の中で VEGFR2 にはほとんど活性を示さないが、HIF-1 $\alpha$  を非常に強く阻害する化合物を見出した。

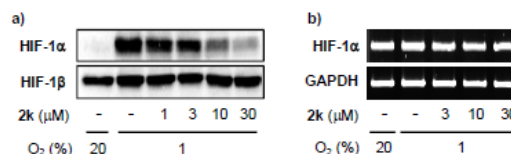
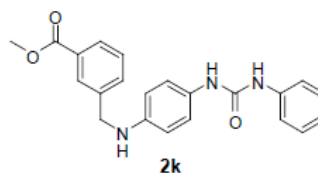


図 2. De novo 分子設計により見出された化合物の構造と、低酸素状態での HeLa 細胞の HIF-1 $\alpha$  阻害と mRNA 発現

(3) 合成した化合物ライブラリーおよそ 100 個を細胞レベルでの HIF-1 $\alpha$  の発現タンパク量を western blotting 法で調べ、阻害活性の高い化合物を探索した結果、およそ 7

$\mu\text{M}$  で HIF-1 $\alpha$  を阻害する化合物を見出した。この化合物は、第 1 相臨床試験中である YC-1 と同等以上の活性があることがわかった。

(4) HIF-1 $\alpha$  の安定化と分解に重要な役割を持つプロテアソームに対する阻害剤の分子設計を行った。プロテアソーム阻害活性が報告されている天然物 Belactosin 骨格に着目し、タンパクへの作用部位にホウ酸基を導入することで、可逆的な阻害剤の開発を行った。合成したホウ酸ペプチド化合物は、0.2  $\mu\text{M}$  の濃度においてプロテアソームのキモトリプシン様酵素活性を 50% 阻害することが分かった。

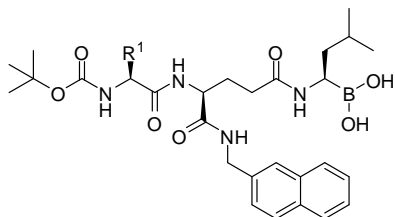


図 3. Belactosin 骨格に基づくホウ酸ペプチドの構造

#### 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 19 件)

1. Y. Miyajima, H. Nakamura, Y. Kuwata, J.-D. Lee, S. Masunaga, K. Ono, K. Maruyama, Transferrin-Loaded nido-Carborane Liposomes: Tumor-Targeting Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy, *Bioconjugate Chemistry*, 17, 1310-1320, 2006, 有
2. C-H. Lee, J. M. Oh, J-D. Lee, H. Nakamura, S. O. Kang, Synthesis of Water Soluble THIQ Derivatives as Potential Boron Neutron Capture Therapy Agents: N-Functionalized o-Carboranyl methylbenzopiperidines, 2, 275-278, 2006, 有
3. Nakamura, H. Usui, T. Horikoshi, R. Nabeyama, W. Ban, H. S. Selective Inhibition of EGFR and VEGFR Tyrosine Kinases Controlled by a Boronic Acid Substituent on 4-Anilinoquinazolines, *YAKUGAKU ZASSHI*, 126, 164-165, 2006, 有
4. Nakamura, H. Sasaki, Y.; Uno, M.; Y oshikawa, T.; Asano, T.; Shibuya, M. Uehara, Y., Synthesis and Biological Evaluation of Benzamides and Benzamidines As Specific Inhibitors of VEGFR Tyrosine Kinases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 5127-5131, 2006, 有
5. Nakamura, H.; Kamakura, T.; Onagi, S., 1,2-Bis(diphenylphosphino)carborane As a Dual Mode Ligand for both the Sonogashira Coupling andHydride-Transfer Steps in Palladium-Catalyzed One-Pot Synthesis of Allenes from Aryl Iodides, *Organic Letters*, 8, 2095-2098, 2006, 有
6. Nakamura, H. Onagi, S. Synthesis and Biological Evaluation of Allenic Quinazolines Using Palladium-Catalyzed Hydride-Transfer Reaction, *Tetrahedron Lett.* 47, 2539-2542, 2006, 有
7. Nakamura, H.; Kuroda, H.; Saito, H.; Suzuki, R.; Yamori, T.; Maruyama, K.; Haga, T., Synthesis and Biological Evaluation of Boronic Acid Containing cis-Stilbenes as Apoptotic Tubulin Polymerization Inhibitors, *ChemMedChem*, 1, 729-740, 2006, 有
8. H. Nakamura, M. Ueno, J.-D. Lee, H. S. Ban, E. Justus, P. Fan, D. Gabel, Synthesis of Dodecaborate-Conjugated Cholesterols for Efficient Boron Delivery in Neutron Capture Therapy, *Tetrahedron Letters*, 48, 3151-3154, 2007, 有
9. J.-D. Lee, M. Ueno, Y. Miyajima, H. Nakamura, Synthesis of Boron Cluster Lipids: closo-Dodecaborate as an Alternative Hydrophilic Function of Boronated Liposomes for Neutron Capture Therapy, *Organic Letters*, 9, 323-326, 2007, 有
10. C.-H. Lee, G. F. Jin, J. H. Yoon, Y. J. Jung, J.-D. Lee, S. Cho, H. Nakamura, S. O. Kang, Synthesis and Characterization of Polar Functional Group Substituted Mono- and Bis-(o-carboranyl)-1,3,5-triazine Derivatives, 49, 159-164, 2008, 有
11. T. Usui, H. S. Ban, J. Kawada, T. Hirokawa, H. Nakamura, Discovery of Indenopyrazoles as EGFR and VEGFR-2 Tyrosine Kinase Inhibitors by *in silico* High-Throughput Screening, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 285-288, 2008, 有
12. M. Uno, H. S. Ban, W. Nabeyama, H. Nakamura, de novo Design and Synthesis of N-Benzylanilines as New Candidates for VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitors, *Org. Biomol. Chem.*, 6, 979-981, 2008, 有

13. H. S. Ban, S. Onagi, M. Uno, W. Nabe-yama, H. Nakamura, Allene as an Alternative Functional Group for Drug Design: Effect of C-C Multiple Bonds Conjugated with Quinazolines on EGFR Tyrosine Kinase Inhibition, *ChemMedChem*, 3, 1094-1103, 2008, 有
  14. N. Sogabe, K. Oda, H. Nakamura, H. Orimo, H. Watanabe, T. Hosoi, M. Goseki-Sone, Molecular effects of the *tissue-nonspecific alkaline phosphatase* gene polymorphism (787T>C) as associated with bone mineral density, 29, 213-219, 2008, 有
  15. M. Uno, H. S. Ban, H. Nakamura, Discovery of 1-[4-(N-Benzylamino)phenyl]-3-phenylurea Derivatives as a New Class of Hypoxia-Inducible Factor-1 Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 3166-3169, 2009, 有
  16. H. Nakamura, M. Watanabe, H. S. Ban, A. Asai, Synthesis and Biological Evaluation of Boron peptide Analogues of Belactosin as Proteasome Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 3220-3224, 2009, 有
- [学会発表] (計 44 件)
1. 中村浩之、臼井大晃、堀越良爾、潘鉉承、上原至雅、渋谷正史、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤を指向したホウ酸キナゾリン誘導体の合成と生物活性、第 10 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月、東京
  2. 中村浩之、臼井大晃、堀越良爾、鍋山航、潘鉉承、ynthesis of Boron Containing Quinazolines: Unprecedented Control of Inhibitions toward EGFR and VEGFR2 Protein Tyrosine Kinases by a Boronic Acid Substituent、2006 年 8 月、サンファン (プエルトリコ)
  3. 中村浩之、臼井大晃、堀越良爾、鍋山航、潘鉉承、第 28 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、4-アニリノキナゾリン骨格へのホウ酸基導入による EGFR および VEGFR チロシンキナーゼ阻害活性制御、第 28 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2006 年 11 月、静岡
  4. 中村浩之、チロシンキナーゼ分子標的とホウ素薬剤の分子設計、静岡県立大学、依頼講演、2006 年 11 月、静岡
  5. H. Nakamura, T. Usui, R. Horikoshi, H. Kuroda, H. S. Ban、Design of Organoboronic Acids for Targeting to Tumoral Vasculature System、10th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry、2006 年 11 月、京都
  6. M. Uno, Y.e Sasaki, T. Yoshikawa, T. Asano, H. S. Ban, H. Nakamura、Synthesis and Biological Evaluation of Benzamides and Benzamidines as Selective Inhibitors of VEGFR Tyrosine Kinases、0th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry、2006 年 11 月、京都
  7. T. Usui, H. S. Ban, M. Maruyama, J. Kawada, T. Hirokawa, H. Nakamura、Structure Based Drug Design and Synthesis of Indenopyrazoles as Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors by in silico Libraly Screening、10th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry、2006 年 11 月、京都
  8. 堀越良爾、潘鉉承、中村浩之、4-アニリノキナゾリン環上のホウ酸基置換部位による EGFR 及び VEGFR チロシンキナーゼ阻害活性の制御、第 25 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2006 年 11 月、名古屋
  9. 臼井大晃、Ban Hyun Seung、川田純平、広川貴次、中村浩之、in silico スクリーニングにより見出したインデノピタゾール骨格を有するチロシンキナーゼ阻害剤の開発、日本薬学会第 127 回年会、2007 年 3 月 28-30 日、富山
  10. 鍋山航、小名木信耶、Ban Hyun Seung、中村浩之、アレニルキナゾリン化合物の合成と生物活性評価、日本薬学会第 127 回年会、2007 年 3 月 28-30 日、富山
  11. Ban Hyun Seung、堀越良爾、鍋山航、中村浩之、4-アニリノキナゾリン骨格におけるホウ素置換部位によるチロシンキナーゼ選択的阻害活性、日本薬学会第 127 回年会、2007 年 3 月 28-30 日、富山
  12. 中村浩之、ホウ素を基軸とした創薬アプローチ、第 17 回万有福岡シンポジウム、招待講演、福岡、2007 年 5 月 12 日  
中村浩之、ホウ素を基軸とした創薬アプローチ、第 17 回万有福岡シンポジウム、招待講演、2007 年 5 月 12 日、福岡
  13. H. Nakamura, R. Horikoshi, T. Usui, H. S. Ban、Controlled Inhibition of EGFR and VEGFR2 Protein Tyrosine Kinases by a Boronic Acid Substituent on 4-Anilinoquinazolines、12th Asian Chemical Congress (12ACC)、2007 年 8 月 23-25 日、マレーシア
  14. T. Usui, H. S. Ban, H. Nakamura、Discovery of Boron Conjugated 4-Anilinoquinazolines as EGFR

- Tyrosine Kinase Inhibitors, Euroboron 4, 2007年9月2-6日, Bremen (ドイツ)
15. H. S. Ban, R. Horikoshi, H. Nakamura, Synthesis of Boron Containing Quinazolines: Control of Inhibitory Activity against EGFR and VEGFR2 Tyrosine Kinase by a Boronic Acid Substituent, Euroboron 4, 2007年9月2-6日, Bremen (ドイツ)
  16. M. Watanabe, H. S. Ban, H. Nakamura, Design, Synthesis, and Biological Evolution of New Peptide Boronic Acids as Proteasome Inhibitors, Euroboron 4, 2007年9月2-6日, Bremen (ドイツ)
  17. H. Nakamura, Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy, 2007 International BNCT Workshop in Korea, 2007年10月5-6日, Chochiwon (韓国)
  18. 中村浩之, Boron-based Drug Design -from Kinase Inhibitors to Neutron Capture Therapy-, 大連理工大学精細化工院、招待講演、2007年10月15日、大連 (中国)
  19. H. Nakamura, Boron-based Drug Design for Cancer Therapy, IUPAC 3rd International Symposium on Novel Materials and Synthesis, 招待講演、2007年10月17-21日, 上海 (中国)
  20. 丸山美菜子、潘 鉉承、中村浩之、De novo 分子設計法を用いた上皮細胞増殖因子受容体の細胞外ドメイン標的阻害剤の開発、日本化学会第88回春季年会、2008年3月26-30日、東京
  21. 上田 記子・渡邊 自由・谷中 佳代子・潘 鉉承・中村 浩之、プロテアソーム阻害剤を指向した新規ペプチドホウ酸の合成と生物活性評価、日本化学会第88回春季年会、2008年3月26-30日、東京
  22. 宇野正治、潘 鉉承、鍋山航、中村浩之、de novo分子設計法を用いた血管内皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤の開発、日本薬学会第128回年会、2008年3月26-28日、横浜
  23. 渡邊自由、谷中佳代子、上田記子、潘 鉉承、中村浩之、プロテアソーム阻害剤を指向した新規ペプチドホウ酸の合成と生物活性評価、日本薬学会第128回年会、2008年3月26-28日、横浜
  24. 上野学、丸山美菜子、野村直裕、潘 鉉承、中井啓、鶴田和太郎、松村明、金田安史、中村浩之、ホウ素と中性子でがんを治す!、日本薬学会第128回年会、ハイライト、2008年3月26-28日、横浜
  25. H. Nakamura, Exploratory Workshop-BioBor, Boronic Acid as an Alternative Functional Group for Drug Design. 招待講演、2008年5月9-11日、Lodz (ポーランド)
  26. 中村浩之、ホウ素を基軸とした創薬アプローチ、第12回がん分子標的治療研究会総会、招待講演、2008年6月26-27日、東京
  27. 田中優子、潘 鉉承、中村浩之、アレンの特異的な反応性を利用した非可逆的EGFRチロシンキナーゼ阻害剤の開発、第12回がん分子標的治療研究会総会、2008年6月26-27日、東京
  28. 上田記子、潘 鉉承、中村浩之、ホウ酸基を導入したBelactosin誘導体によるプロテアソーム阻害作用、第12回がん分子標的治療研究会総会、2008年6月26-27日、東京
  29. 潘 鉉承、宇野正治、中村浩之、Development of HIF-1 $\alpha$  inhibitor: Inhibition by VEGFR inhibitor AAL993 of HIF-1 $\alpha$  activation、第9回文部科学省特定領域研究「がん」5領域若手研究者ワークショップ、2008年9月3-6日、茅野
  30. 潘 鉉承、宇野正治、中村浩之、VEGFR 阻害剤 AAL993 による HIF 活性化抑制作用、第27回メディシナルケミストリーシンポジウム、2008年11月26-28日、大阪
  31. 宇野正治、潘 鉉承、中村浩之、低酸素誘導因子(HIF)-1 $\alpha$ 活性化阻害剤: 1-[4-(N-Benzylamino)phenyl]-3-phenylurea誘導体の合成及び生物活性評価、第27回メディシナルケミストリーシンポジウム、2008年11月26-28日、大阪
  32. 田中優子、羽鳥雅子、潘 鉉承、中村浩之、EGFRチロシンキナーゼへの非可逆的阻害作用を指向したアレニルキナゾリンの開発と生物活性評価、第27回メディシナルケミストリーシンポジウム、第27回メディシナルケミストリーシンポジウム、2008年11月26-28日、大阪
  33. 潘 鉉承、宇野正治、中村浩之、VEGFR 阻害剤AAL993によるHIF活性化抑制作用、第6回がんとハイポキシア研究会、2008年11月29-30日、広島
  34. 宇野正治、潘 鉉承、中村浩之、酸素誘導因子(HIF)-1 $\alpha$ 活性化阻害剤: 1-[4-(N-Benzylamino)]phenyl-3-phenylurea誘導体の合成及び生物活性評価、第6回がんとハイポキシア研究会、2008年11月29-30日、広島
  35. 丸山美菜子、清水一希、潘 鉉承、中村浩之、Hypoxia-Inducible Factor (HIF)活性化阻害能を有するホウ素化合物の開発、第6回がんとハイポキシア研究会、

- 2008年11月29-30日、広島
36. 中村浩之、腫瘍血管新生を標的とした創薬アプローチ、第2回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム、特別講演、2009年2月5日、岡山
  37. 潘鉉承、矢守隆夫、Kang Sang Ook、中村浩之、カルボラン含有トリアジン類のトポイソメラーゼ阻害活性、日本薬学会第129回年会、日本薬学会第129回年会、京都
  38. 田中優子、羽鳥雅子、潘鉉承、中村浩之、アレンの特異な反応性を利用した非可逆的EGFRチロシンキナーゼ阻害剤の開発および生物性評価、日本薬学会第129回年会、2009年3月26-28日、京都
  39. 清水一希、丸山美菜子、潘鉉承、中村浩之、Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) 活性化阻害能を有するホウ素化合物の開発、日本薬学会第129回年会、2009年3月26-28日、京都
  40. 丸山美菜子、清水一希、潘鉉承、中村浩之、カルボランの立体電子的効果を利用したHIF-1阻害剤の開発、日本薬学会第129回年会、2009年3月26-28日、京都
  41. 宇野正治、潘鉉承、中村浩之、低酸素誘導因子 (HIF) -1 $\alpha$  活性化阻害剤：1-[4-(N-Benzylamino)]Phenyl-3-phenylurea 誘導体の合成及び生物活性評価低酸素誘導因子 (HIF) -1 $\alpha$  活性化阻害剤：1-[4-(N-Benzylamino)]Phenyl-3-phenylurea 誘導体の合成及び生物活性評価、2009年3月26-28日、京都
  42. 鍋山航、臼井大晃、潘鉉承、中村浩之、ホウ素含有4-アニリノキナゾリンによるEGFRチロシンキナーゼ持続的抑制作用、日本薬学会第129回年会、2009年3月26-28日、京都
  43. 潘鉉承、宇野正治、中村浩之、VEGF阻害剤AAL993によるHIF-1活性化抑制とその作用機序、日本薬学会第129回年会、2009年3月26-28日、京都
  44. 中村浩之、ホウ素を基軸とした創薬アプローチ、第17回万有福岡シンポジウム、招待講演、2007年5月12日、福岡、

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：含ホウ素キナゾリン誘導体  
 発明者：中村浩之、堀越良爾、潘鉉承  
 権利者：(株)メビオファーム  
 種類：特願  
 番号：2006-213764  
 出願年月日：2006年  
 国内外の別：国内

名称：チオクト酸誘導体を含有する生理活性組成物

発明者：伊東忍、中村浩之  
 権利者：(株)アイティーオー  
 種類：特願  
 番号：2007-341701  
 出願年月日：2007年  
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ  
<http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~20021059/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 浩之 (NAKAMURA HIROYUKI)  
 学習院大学・理学部・化学科・教授  
 研究者番号：30274434

### (2) 研究分担者

潘 鉉承 (BAN HYONSUN)  
 学習院大学・理学部・化学科・助教  
 研究者番号：60433710

### (3) 連携研究者

鍋山 航 (NABEYAMA WATARU)  
 学習院大学・理学部・化学科・客員研究員  
 研究者番号：90448952