

平成21年 6月12日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790098
 研究課題名 (和文) 新しい *in silico* 分子設計手法を用いた Glyoxalase I 阻害剤の創製
 研究課題名 (英文) Creation of Glyoxalase I inhibitors with novel *in silico* drug design methods
 研究代表者
 高澤 涼子 (TAKASAWA RYOKO)
 東京理科大学・薬学部・助教
 研究者番号：10398828

研究成果の概要：Glyoxalase I (GLO I) は、解糖系で生じるカルボニルストレスの消去システムを担う主酵素であり、大腸がん、肺がん及び前立腺がんや、抗がん剤に耐性を示す培養がん細胞株で高発現がみられることが報告されていることから、新しいがん治療薬開発のターゲットとして非常に有望視されている。そこで本研究では、GLO I を新規制がん剤開発の創薬ターゲットとし、*in silico* 設計及び有機合成展開によって新規 GLO I 阻害剤リード化合物を創製することを目的とした。まず、*in silico* で基質遷移状態を mimic することが予測された 4 位=O, 5 位-OH flavonoid 化合物の GLO I 阻害効果についての構造活性相関解析を行い、その解析結果に基づいて GLO I 阻害剤設計の pharmacophore を構築して、新規骨格をもつ GLO I 阻害剤の *in silico* スクリーニングを行った。それらについて GLO I 酵素反応生成物 *S*-D-Lactoylglutathione の 240 nm における吸光度測定による *in vitro* assay を行い、GLO I 阻害活性を評価した。得られた GLO I 阻害剤候補化合物について有機合成展開を行い、GLO I 阻害活性を *in vitro* assay で評価し、構造活性相関解析を行った。*in silico* スクリーニング及び *in vitro* assay によって、新規 GLO I 阻害剤候補化合物として TLSC702 を得た。TLSC702 は、既存の GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤 *S*-*p*-bromobenzylglutathione (BBG) よりも高い GLO I 阻害効果を示した。これについて有機合成展開を行った結果、*in vitro* assay で TLSC702 と同等の GLO I 阻害活性を示す化合物が数種得られた。本研究によって新規骨格を有する GLO I 阻害剤候補化合物が得られたことは、新規制がん剤開発のためのリード化合物創製において大変意義深いものであると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計

1. 研究開始当初の背景

現在の日本において、2人に1人ががんに罹り、3人に1人ががんで死亡するといわれており、10年後には3人に2人ががんに罹り2人に1人ががんで死亡すると推測されている。このような状況から、平成19年4月1日にがん対策基本法が施行されるなど、がん治療が現在の日本の医療において非常に重要視されており、がんの克服こそが、国民が望む医療の一つとなっている。このように多くのがん患者が存在するなかで、がん治療を継続的に受けている患者数は全人口の約1%となっている。継続治療のほとんどが、化学療法や放射線療法である。しかしながら、この化学療法や放射線療法への感受性には個人差があり、化学療法が無効の場合がある。また、化学療法が有効で継続的に治療を行ったとしても、抗がん剤の継続投与のためにがん細胞が形質変化を起こし、抗がん剤耐性がん細胞が出現し、抗がん剤の効果が減弱してしまう場合もある。このような化学療法が無効の患者や抗がん剤耐性がん患者の多くが、化学療法耐性がん細胞にも高い効果を示す、新たな作用機序の抗がん剤開発を強く望んでいる。そこで当研究室は、新たな作用機序の抗がん剤開発を目的とし、創薬ターゲットとしてカルボニルストレス除去システムを担う主酵素である Glyoxalase I (GLO I) に着目した。この GLO I は、解糖系の代謝副産物として生じる反応性の高いジカルボニル化合物である Methylglyoxalase (MG) を無毒な S-D-Lactoylglutathione へと変換させる反応を触媒する酵素である。反応性の高いジカルボニル化合物である MG は、DNA やタンパク質を修飾し、細胞死 (アポトーシス) を誘導することが知られている。この GLO I 酵素システムは、全ての哺乳動物細胞で一樣に存在していることや、直腸がん、前立腺がん、肺がんなどのがん細胞において GLO I の発現が高いとの報告や、抗がん剤抵抗性ヒト白血病細胞で GLO I が高発現しているという報告もある。さらに、GLO I の高発現がエトポシドやアドリアマイシンなどの抗がん剤に対する抵抗性獲得に関与しているという報告もある。これらの報告から、アポトーシス抑制性疾患であるがんが、アポトーシスを回避して無秩序な高い細胞増殖能を確保するために必要なエネルギーを、活発な嫌氣的解糖系によって補っていると推測される。嫌氣的解糖が活発に行われると、代謝副産物として有害物質である MG が生成される。それを解毒するために、がん細胞は GLO I 発現量を増加させて MG 代謝能を高めてい

ると考えて矛盾はない。

このような知見から、GLO I 阻害剤は、MG を蓄積させることによってがん細胞特異的にアポトーシスを誘導するという新しい作用機序の抗がん剤として期待される。また、最近では GLO I 活性が破骨細胞の形成に必須であるという報告もされている。今後さらなるバリデーションが必要ではあるが、GLO I が抗がん剤だけではなく、骨粗しょう症などの慢性骨疾患治療薬の創薬ターゲットとなることも期待されている。

このように抗がん剤や骨粗しょう症の治療薬のターゲットとして有望なヒト GLO I は、2 量体構造をもち、それぞれに亜鉛 (Zn^{2+}) を保持する金属結合酵素である。これまでに、反応基質の1つである GSH を基本骨格とする化合物が数多く開発されてきた。S_p-bromobenzylglutathione (BBG) もその1つである。BBG は、*in vitro* において高い阻害能 ($K_i = 0.077 \mu M$) を示す。また、BBG のシクロペンチルエステル体である BBGC を、ヒトがん細胞を移植した実験用マウスに 80 ~ 100 mg/kg 量投与したところ、がん細胞の増殖を抑制したという報告もある。しかし、GSH 誘導体はペプチド骨格であり、負電荷をもつ 2 つのカルボキシ基が膜透過性・吸収性・安定性に影響を与えることから、抗がん剤開発のリード化合物としての臨床応用は難しいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、*in silico* 分子設計手法を用い、GSH 誘導体とは異なる新規骨格を有する特異的ヒト GLO I 阻害剤の創製を目的とした。まず、*in silico* 分子設計手法の情報の蓄積を行うために、GLO I の基質である MG/GSH 遷移状態をミミックする部分構造をもつフラボノイド化合物を複数選択し、*in vitro* の GLO I 阻害活性評価と構造活性相関解析を行った。そして、この構築したファーマコフォアを用いて GLO I 阻害剤リード化合物の *in silico* スクリーニングを行い、新規骨格を持つリード化合物として TLSC-702 を見出した。この化合物について、*in silico* 結合様式に基づいて構造展開を行い、より阻害効果や細胞膜浸透性の高い化合物へと最適化を進めていくための基盤となる研究を行った。

3. 研究の方法

in vitro GLO I 阻害効果の評価

GLO I 酵素反応の生成物である S-D-Lactyl glutathione は、240 nm に吸光をもつ。この性質を利用して、吸光度測定によって GLO I 活

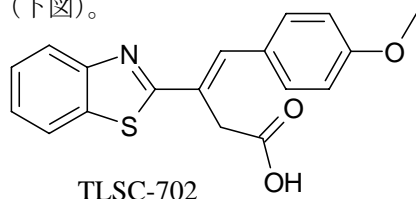
性を定量した。GLO I 酵素反応は、50 μ l の系で行った。基質溶液（反応系での最終濃度 7.9 mM MG, 1 mM GSH, 14.6 mM $MgSO_4$, 182 mM imidazole-HCl, pH 7.0）を 25°C で 15 分間プレインキュベートし、その一方で、hGLO I と各濃度の GLO I 阻害剤候補化合物（最終濃度は 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M）の混合液 25 μ l を 384 well plate に分注し、室温で 10 分プレインキュベートした。その後、酵素／阻害剤混合液が入っている well に基質溶液を 25 μ l 加えて反応を開始させ、25°C で 10 秒毎に 5 分間、240 nm における吸光度を測定し、各阻害剤濃度における GLO I 阻害 (%) を算出した。X 軸に阻害剤濃度の対数、Y 軸に GLO I 阻害 (%) をとり、50% 阻害に対応する濃度 (IC_{50}) を算出した。

4. 研究成果

(1) GLO I/inhibitor ファーマコフォア構築 *in silico* で基質遷移状態を mimic することが予測された 4 位=O, 5 位-OH flavonoid 化合物の *in vitro* 評価の結果と構造の特徴の比較を行った。その結果に基づいて GLO I/inhibitor ファーマコフォアを構築した。

(2) GLO I 阻害剤候補化合物新規骨格 TLSC-702 の *in vitro* 評価

上述のファーマコフォアを利用して、さらなる大規模な *in silico* スクリーニングを行うことで、新規骨格を有する GLO I 阻害剤の探索を試みた。まず、ZINC の化合物データベースから分子量 150~350、溶解度の指標である $xlogP$ の値が 2~4 の条件でフィルタリングしたところ、80 万件の化合物が選択された。この中からランダムに 10 万件ずつ抽出し、上述のファーマコフォアを用いてフィルタリングし、さらにドッキングスタディによる予測結合親和性の高い化合物を候補化合物として選定した。これらについて *in vitro* assay による阻害能評価を行い、最も高い阻害能を有する化合物として TLSC-702 を見出した（下図）。



この化合物の *in vitro* での阻害効果は、 IC_{50} = 4.46 μ M となり、既存の阻害剤 BBG よりも約 10 倍高い阻害能を示した。ファーストヒットとして十分に高い阻害能を有すること、また、分子量も比較的小さく、今後の構造展開がしやすいことから、この化合物を、抗がん剤開発を目指した GLO I 阻害剤のリード化合物として、さらなる構造展開を行った。

(3) GLO I 阻害効果向上のための構造検討①

まず、TLSC-702 のメトキシベンゼン部分のメトキシ基の位置の検討を行った。メトキシ基がパラ位に存在する TLSC-702 と、オルト位に存在する TLSC-835、及びメタ位に存在する TLSC-837 の 2 化合物を比較したところ、オルト位の TLSC-835 が IC_{50} = 55.9 μ M となり、TLSC-702 よりも一桁阻害能が低下した。一方、メタ位の TLSC-837 は IC_{50} = 4.68 μ M となり、TLSC-702 とほぼ同等という結果となった。次に、TLSC-702 のメトキシベンゼン部分の置換基の大きさによる阻害効果への影響を調べるため、メトキシ基と同程度の大きさをもつ Br 基を有する TLSC-838、メトキシ基よりも容積的に小さい水酸基を有する TLSC-839 の阻害効果を TLSC-702 と比較検討した。その結果、置換基が同程度の大きさである TLSC-838 の IC_{50} は 6.93 μ M であり、TLSC-702 と同等であった。それに対し、より小さな置換基を有する TLSC-839 の IC_{50} は 16.5 μ M であり、阻害効果が減弱した。また、ベンゾチアゾール環の硫黄原子の阻害効果に対する影響を調べるために、TLSC-838 の硫黄原子を窒素原子に変えた TLSC-836 の阻害効果をもとの化合物 TLSC-838 と比較した。その結果、TLSC-836 は IC_{50} > 100 μ M となり、阻害効果が大きく減弱した。

(4) GLO I 阻害効果向上のための構造検討②

MG/GSH の基質遷移状態及びフラボノイド化合物において、亜鉛と配位する部分は平面構造をとっている。したがって、基本骨格 TLSC-702 において亜鉛に配位すると考えられるカルボキシル基を有する側鎖部分を平面構造に固定することにより、阻害能が向上するのではないかと考え、カルボキシル基が二重結合で固定された TLSC-702-002 との比較を行った。しかし、TLSC-702-002 の IC_{50} は 26.5 μ M となり、TLSC-702 よりも一桁阻害能が低下する結果となった。さらに多くの構造活性相関情報を得るため、数種の TLSC-702 類縁体化合物を *in vitro* assay によって評価した。各化合物の特徴は以下のとおりである。TLSC-702-003 は、亜鉛に配位するカルボキシル基の炭素鎖長が 1 つから 2 つに延長した化合物であり、亜鉛に配位しやすい距離の検討に用いた。TLSC-702-004 は、ベンゾチアゾール部分とメトキシベンゼン部分との間にある二重結合を単結合に変換した化合物で、化合物のフレキシビリティの GLO I 阻害への影響の検討に用いた。TLSC-702-005 は、ベンゾチアゾールの硫黄原子を酸素原子に変換し、ベンゾオキサゾールとした化合物で、硫黄のもつ電子対の影響の検討に用いた。TLSC-702-007 は、カルボキシル基を亜鉛と強力に配位するヒドロキサム酸構造に変換した化合物で、亜鉛への配位によってのみ GLO I

阻害が生じるのか否かを検討するために用いた。TLSC-702-008 と TLSC-702-010 は、メトキシベンゼン部分に大きな置換基を付加することによって阻害効果が高まると予測されたことから、より大きな置換基を付加した際に阻害効果が増強されるか否かの検討に用いた。TLSC-702-011 は、ベンゾチアゾールのベンゼン環の阻害効果に対する影響を検討するために用いた。それぞれの化合物の阻害効果(最終濃度 100 μM)を評価した結果、TLSC-702-002, 005, 008, 010 の 4 化合物で TLSC-702 と同程度、またはそれ以上の阻害効果が得られた。さらに、これらの化合物の IC_{50} はそれぞれ、TLSC-702-002 は 26.5 μM 、005 は 13.5 μM 、008 は 3.7 μM 、010 は 3.9 μM であった。

(5) 考察と今後の方針

TLSC-702 と GLO I のドッキングスタディから、この化合物の中で亜鉛に配位する部分構造はカルボキシル基であると予測される。そこで、このカルボキシル基を亜鉛に強く配位するヒドロキサム酸構造に置き換えた TLSC-702-007 について TLSC-702 と阻害効果を比較したところ、その阻害効果は TLSC-702 よりも低くなった。この結果から、TLSC-702 と GLO I との結合には活性中心の亜鉛との配位だけではなく、別の部位における相互作用も重要であるということが考えられる。これらの実測結果を *in silico* 分子設計にフィードバックし、既存の阻害剤である BBG と GLO I の結合様式について検討を行った。その結果、BBG と GLO I との結合については、従来考えられていた活性中心の亜鉛との配位の寄与は小さいものであり、それよりも GLO I の Arg37 と Arg122 と BBG のカルボン酸との間の水素結合の寄与が大きいことが予測された。同様に TLSC-702 と GLO I の結合様式について検討した。その結果、TLSC-702 と GLO I の結合については、TLSC-702 のカルボン酸部分の亜鉛への配位の寄与が大きく、それ以外に弱いながらもメトキシ基に含まれる酸素原子と Arg37 との結合が寄与すると予測された。

以上から、特異的かつ阻害能の高い GLO I 阻害剤を得るには、亜鉛への配位と、Arg37 と Arg122 との水素結合の両方を形成することのできる化合物を設計すればよいと考えられる。今後、この 2 つの条件を満たすことのできる化合物を設計するために、TLSC-702 の母核の改良も含めて検討を進めていく予定である。

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 7 件)

- (1) Sakai J., Yoshimori A., Nose Y., Mizoroki A., Okita N., Takasawa R., Tanuma S. Structure-based discovery of a novel non-peptidic small molecular inhibitor of caspase-3. *Bioorg Med Chem.*, 16: 4854-4859, 2008. 査読有
- (2) Aoki S., Sakurama K., Ohshima R., Matsuo N., Yamada Y., Takasawa R., Tanuma S., Takeda K., Kimura E. Design and Synthesis of A Caged Zn(2+) Probe, 8-Benzenesulfonyloxy-5-N,N-dimethylaminosulfonylquinolin-2-ylmethyl-pendant 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane, and Its Hydrolytic Uncaging upon Complexation with Zn(2+). *Inorg Chem.*, 47: 2747-2754, 2008. 査読有
- (3) Hayakawa A., Kawamoto Y., Nakajima H., Sakai J., Takasawa R., Nakashima I., Magae J., Tanuma S. Bid truncation mediated by caspases-3 and -9 in vinorelbine-induced apoptosis. *Apoptosis.*, 13: 523-530, 2008. 査読有
- (4) Takasawa R., Takahashi S., Saeki K., Sunaga S., Yoshimori A., Tanuma S. Structure-activity relationship of human GLO I inhibitory natural flavonoids and their growth inhibitory effects. *Bioorg Med Chem.*, 16: 3969-3975, 2008. 査読有
- (5) Nakajima H., Mizuta N., Sakaguchi K., Fujiwara I., Yoshimori A., Takahashi S., Takasawa R., Tanuma S. Development of HER2-antagonistic peptides as novel anti-breast cancer drugs by *in silico* methods. *Breast Cancer.*, 15: 65-72, 2008. 査読有
- (6) Yoshimori A., Sakai J., Sunaga S., Kobayashi T., Takahashi S., Okita N., Takasawa R., Tanuma S. Structural and functional definition of the specificity of a novel caspase-3 inhibitor, Ac-DNLD-CHO. *BMC Pharmacol.*, 7: 8-23, 2007. 査読有
- (7) Maruta H., Okita N., Takasawa R., Uchiumi F., Hatano T., Tanuma S. The involvement of ATP produced via (ADP-Ribose)n in the maintenance of DNA replication apparatus during DNA repair. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(3): 447-450, 2007. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 平成19年度 がん特定 若手研究者ワークショップ (2007年8月29日-9月1日) 蓼科
高澤涼子, 高橋沙希, 須永賢, 田沼靖一

- In silico* molecular design of human glyoxalase I inhibitors
- (2) 第 66 回 日本癌学会学術総会 (2007 年 10 月 5 日) パシフィコ横浜
Ryoko Takasawa, Atsushi Yoshimori, Sei-ichi Tanuma
Structure-activity relationship of human Glyoxalase I inhibitory flavonoids and their growth inhibitory effects
- (3) 第 30 回日本分子生物学会年会／第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (2007 年 12 月 14 日) パシフィコ横浜
高橋沙希, 須永賢, 高澤涼子, 田沼靖一
in silico 分子設計のための新規 GLO I/Inhibitors ファーマコフォアの構築
- (4) 日本薬学会 第 129 年会 (2009 年 3 月 26 日) 京都
高澤涼子, 高橋沙希, 塩野崎宣裕, 田中亮, 吉森篤史, 内呂拓実, 田沼靖一
in silico 設計と有機合成展開による新規 Glyoxalase I 阻害剤の創製

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：グリオキサラーゼ I 阻害剤
発明者：田沼靖一, 高澤涼子, 内呂拓実
権利者：学校法人 東京理科大学
種類：特願
番号：2009-75170
出願年月日：2009 年 3 月 25 日
国内外の別：国内・外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高澤 涼子 (TAKASAWA RYOKO)
東京理科大学・薬学部・助教
研究者番号：10398828

