

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15253

研究課題名（和文）ペプチド環化反応をトリガーとした抗がん剤新規放出システム搭載型ADCの創出研究

研究課題名（英文）Development of ADC with novel anticancer drug release system triggered by peptide cyclization reaction

研究代表者

傳田 将也（DENDA, Masaya）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・助教

研究者番号：00813891

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：抗体-抗がん剤複合体（ADC）は、新たな抗がん剤として注目を集めている。本研究では、ADCの問題点である抗がん剤の非選択的放出抑制を目的として、ペプチド環化反応をトリガーとした活性型抗がん剤放出システムの開発を目指し研究を行った。本研究では、ADCに搭載する抗がん剤としては二環性環状ペプチドであるアマニチンに着目した。そこでまず、新規アマニチン合成法を確立した。さらに研究代表者らが開発した酸性条件下N-Sアシル基転移反応によりチオエステルへ変換する分子を利用することで、環状ペプチドの生成と放出が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体-薬物複合体（ADC）は、新たな抗がん剤として非常に有用である。しかしながら抗体-薬物間リンカーの非選択的な切断による薬物放出は、全身性副作用発現などに関与する非常に重大な問題点である。本研究で開発を目指してきた、がん細胞内選択的なペプチド環化反応による活性化とこれをトリガーとする活性型ペプチド性抗がん剤放出システムは、従来のADCが有する上述問題点を解決する戦略となり得ることから、社会的意義は非常に大きいものである。

研究成果の概要（英文）：Antibody-drug conjugates (ADCs) are attracting attention as new anticancer agents. In this study, we aimed to develop an active anti-cancer drug release system triggered by peptide cyclization reaction to suppress non-selective release of anti-cancer drugs, which is a problem of ADCs. In this study, we focused on Amanitin, a bicyclic cyclic peptide, as an anticancer drug to be loaded on ADCs. First, a novel synthetic method for amanitin was established. Furthermore, we demonstrated that the release of peptides can be triggered by the formation of cyclic peptides by using a probe that converts to thioesters by N-S acyl-transfer reaction under acidic conditions.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：ペプチド環化反応 ADC alpha-Amanitin N-Sアシル基転移反応

### 1. 研究開始当初の背景

新たな抗がん剤として、抗体—抗がん剤複合体 (Antibody—Drug Conjugate (ADC)) が注目されている (図 1)。ADC は、抗体と抗がん剤を「リンカー」で結合した構造であり、「抗体の抗原認識能」と「低・中分子抗がん剤の殺細胞能」双方の機能を有する。抗がん剤の ADC 化戦略は、抗がん剤の標的がん細胞選択的送達を可能とし、強力な殺細胞活性のため単剤利用が困難であった抗がん剤の安全な利用を可能とした。さて本戦略では、がん細胞内選択的かつ効率的な抗体と抗がん剤の分離を可能とする「cleavable リンカー」の利用が必須となる。従来の cleavable リンカーには、がん細胞で過剰発現するリソソーム酵素カテプシン B により切断されるバリン—シトルリン (Val-Cit) ジペプチドリンカー (Doronina, O. S. et al. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 778.) や還元条件で切断されるジスルフィドリンカー (Pillow, T. H. et al. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 366.) などがある。しかし細胞外プロテアーゼなどによるこれらリンカーの非特異的切断の完全な抑制は困難であり、抗がん剤の非選択的放出による全身性副作用発現が ADC における最大の問題となっている。このため、これら問題を解決する新たな戦略開発が求められている。

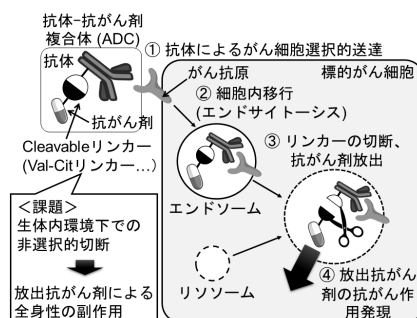


図 1. 抗体—抗がん剤複合体

### 2. 研究の目的

非特異的リンカー切断に伴う、抗がん剤の非選択的放出に起因する ADC の副作用発現抑制を指向した革新的なシステム創出を本研究の目的としていた。ここで革新的なシステム基盤には、がん細胞内選択的な抗がん剤の「構造変化すなわちペプチドの環化による活性化」と、これをトリガーとする「抗体—抗がん剤間の cleavable リンカーの切断」による“活性型”抗がん剤のがん細胞内選択的な放出である (図 2)。

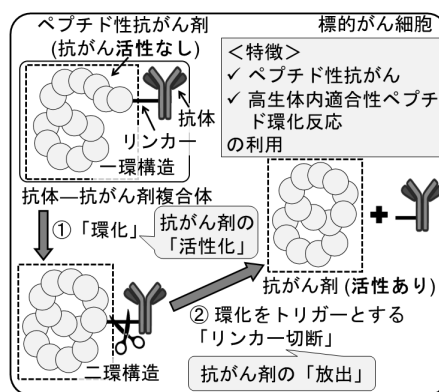


図 2. 本研究の戦略

### 3. 研究の方法

本研究では、ADC 搭載抗がん剤には RNA ポリメラーゼ II 阻害剤である「二環性環状ペプチド  $\alpha$ -Amanitin」誘導体 (Pahl, A. et al. *Drug Discov. Today Technol.* **2018**, *30*, 85.) に着目し、本ペプチドの環化 (一環構造 (1) 二環構造 (2)) (図 3) を cleavable リンカー切断トリガーとする戦略を立案した。そこでまず、二環性環状ペプチド  $\alpha$ -Amanitin 中の特徴的構造であるトリプタチオニ

ン構造の新規構築法について検討を行なった。続いて、ペプチド環化反応をトリガーとした環状ペプチド放出の検証として、研究代表者らが開発した弱酸性条件下 N-S アシル基転移反応にチオエステルに変換する *N*-Sulfanylethylcoumarinyl amide (SECmide) とチオール基導入型スレオニン間でのラクトン化について検討した。

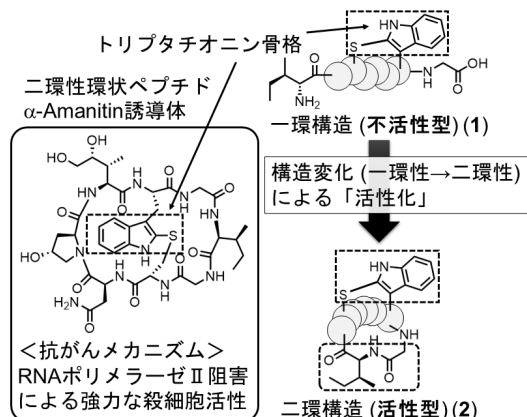


図 3.  $\alpha$ -Amanitin の抗体への搭載戦略

#### 4. 研究成果

研究代表者が所属する研究グループではこれまでに、保護システインスルホキシドとトリプトファン側鎖インドール環間での新規トリプタチオン骨格構築反応を開発している。本法は、グアニジン塩酸塩 ( $Gn \cdot HCl$ ) 存在下、酸性条件でのメトキシベンジル保護システインスルホキシドの S-クロロシステインへの活性化と続くインドール環からの求核攻撃によりトリプタチオン骨格を構築する (図 4 (A))。さて本研究で着目した  $\alpha$ -Amanitin 類は、分子内にトリプタチオン骨格を有することから、開発法を用いた新たな  $\alpha$ -Amanitin 合成法を確立した (図 4 (B))。さらに本法を用いて ADC へ搭載する  $\alpha$ -Amanitin 環化前駆体の合成を進めている。

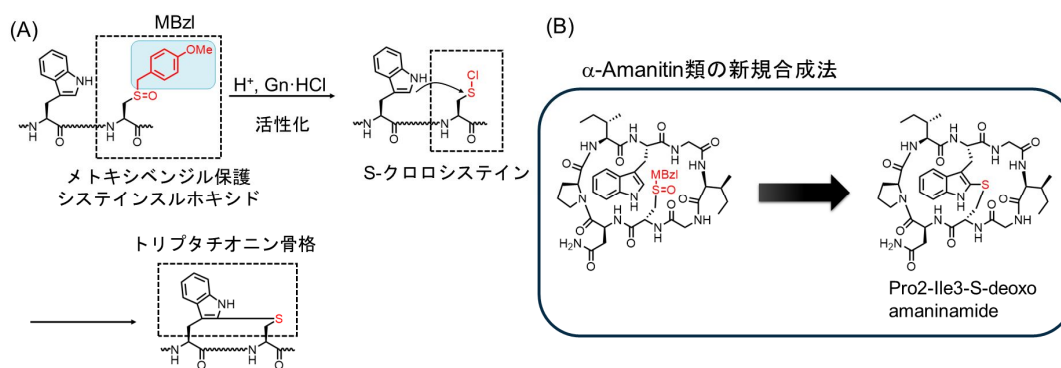


図 4. トリプタチオン骨格形成と  $\alpha$ -Amanitin 類の合成

また研究代表者が所属する研究グループでは過去に、酸性条件下 N-S アシル基転移反応によりチオエステルに変換する *N*-Sulfanylethylcoumarinyl amide (SECmide) を開発している (Eto, M. et al. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4416.) (図 5A)。そこで本 SECmide を利用することで、弱酸性条件であるが細胞内においてチオエステルを生成し、本チオエステルを足掛かりとして連続する化学選択的 S-S、S-O (S-N) アシル基転移反応により環状ペプチドの生成とリンカーの放出が可能であると考えた。そこで SECmide とチオール基導入型スレオニンを含むモデルペプチドを用いて環化反応について検討を行った。その結果、中性条件 (pH 6.5) では、24 h 後には原料ペプチドが消失し環化ペプチドを生成した。また弱酸性条件 (pH 5.0) でも、環化速度は低下するものの環状ペプチドの生成を確認した (図 5B)。本結果は、がん細胞内選択的ペプチド環化反応を利用した ADC 開発に繋がる結果である。

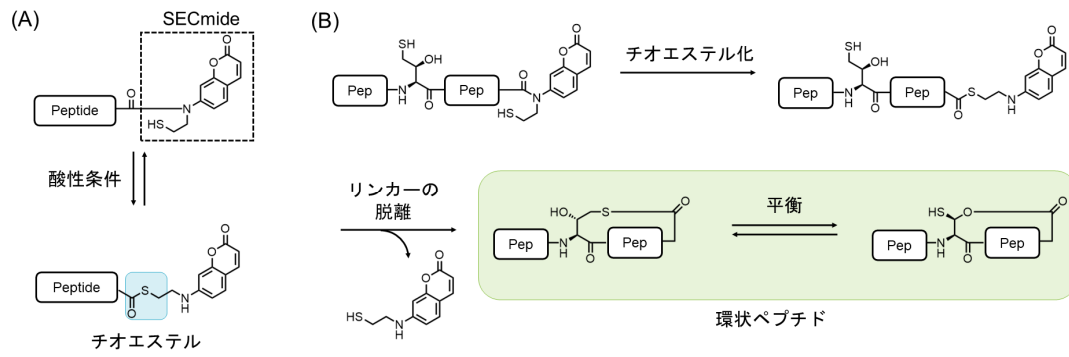


図 5. SECmide を利用した環状ペプチドの合成

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Miyake Masato, Sobajima Mitsuaki, Kurahashi Kiyoe, Shigenaga Akira, Denda Masaya, Otaka Akira, Saio Tomohide, Sakane Naoki, Kosako Hidetaka, Oyadomari Seiichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Identification of an endoplasmic reticulum proteostasis modulator that enhances insulin production in pancreatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 996 ~ 1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2022.01.002	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 -
1. 著者名 Sato Daiki, Denda Masaya, Tsunematsu Honoka, Tanaka Naonobu, Konishi Isamu, Komiya Chiaki, Shigenaga Akira, Otaka Akira	4. 巻 58
2. 論文標題 Late-stage macrolactonisation enabled by tandem acyl transfers followed by desulphurisation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 2918 ~ 2921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC07248J	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 -
1. 著者名 Denda Masaya, Otaka Akira	4. 巻 70
2. 論文標題 Advances in Preparation of Peptide and Protein Thioesters Aiming to Use in Medicinal Sciences	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 316 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-01019	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 -
1. 著者名 Kobayashi Daishiro, Kuraoka Eisuke, Hayashi Junya, Yasuda Takuma, Kohmura Yutaka, Denda Masaya, Harada Norio, Inagaki Nobuya, Otaka Akira	4. 巻 13
2. 論文標題 S-Protected Cysteine Sulfoxide-Enabled Tryptophan-Selective Modification with Application to Peptide Lipidation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.2c00161	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 -

1. 著者名 Ohkawachi Kento, Anzaki Kaito, Kobayashi Daishiro, Kyan Ryuji, Yasuda Takuma, Denda Masaya, Harada Norio, Shigenaga Akira, Inagaki Nobuya, Otaka Akira	4. 巻 29
2. 論文標題 Residue Selective C-H Sulfenylation Enabled by Acid Activated S Acetamidomethyl Cysteine Sulfoxide with Application to One Pot Stapling and Lipidation Sequence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202300799	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 -

1. 著者名 Neishi Mami, Hamano Hirofumi, Niimura Takahiro, Denda Masaya, Yagi Kenta, Miyata Koji, Lin Tsung-Jen, Higashionna Tsukasa, Goda Mitsuhiro, Zamami Yoshito, Ishizawa Keisuke, Nawa Hideki	4. 巻 475
2. 論文標題 Structural characterization of the optical isomers esomeprazole and omeprazole using the JADER and FAERS databases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 116632 ~ 116632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2023.116632	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 -

1. 著者名 Tsuji Takashi, Tsunematsu Honoka, Imanishi Masaki, Denda Masaya, Tsuchiya Koichiro, Otaka Akira	4. 巻 95
2. 論文標題 Enhanced tumor specific drug release by hypoxia sensitive dual-prodrugs based on 2-nitroimidazole	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 129484 ~ 129484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2023.129484	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 -

1. 著者名 Imanishi Masaki, Inoue Takahisa, Fukushima Keijo, Yamashita Ryosuke, Nakayama Ryo, Nojima Masataka, Kondo Kosuke, Gomi Yoshiki, Tsunematsu Honoka, Goto Kohei, Miyamoto Licht, Funamoto Masafumi, Denda Masaya, Ishizawa Keisuke, Otaka Akira, Fujino Hiromichi, Ikeda Yasumasa, Tsuchiya Koichiro	4. 巻 153
2. 論文標題 CA9 and PRELID2; hypoxia-responsive potential therapeutic targets for pancreatic ductal adenocarcinoma as per bioinformatics analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 232 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.10.003	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14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林 隼矢, 小林 大志朗, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 Lossen転位を起点とした合成後期ペプチド主鎖ヘテロ化反応の開発
3. 学会等名 創薬懇話会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junya Hayashi, Daishiro Kobayashi, Masaya Denda and Akira Otaka
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF INTRAMOLECULAR THIOETHERIFICATION ON PEPTIDE BACKBONE FOR CHEMICAL SYNTHESIS OF SACTIPEPTIDE
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日高 功太, 小林 大志朗, 林 隼矢, 大川内 健人, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF ONE-POT/STEPWISE DISULFIDE BOND-FORMING REACTION ENABLED BY S-PROTECTED CYSTEINE SULFOXIDE WITH ITS APPLICATION TO INSULIN SYNTHESIS
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日高 功太, 小林 大志朗, 林 隼矢, 大川内 健人, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 S-保護システインスルホキッドを利用したトリプトファン選択的修飾反応の開発とペプチドヘテロ二量化法への応用展開
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大平 実佳, 大川内 健人, 安崎 快登, 北條 三奈, 水口 仁志, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 スルフェニル化Tyrを利用したTyr-Tyrピアリール構造含有ペプチド合成法の開発
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野中 智貴, 小林 大志朗, 倉岡 瑛祐, 林 隼矢, 安田 拓真, 光村 豊, 傳田 将也, 原田 範雄, 稲垣 暢也, 大高 章
2. 発表標題 S-保護システインスルホキシドを利用したトリプトファン選択的脂肪鎖修飾法の開発と応用
3. 学会等名 第39回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 隼矢, 小林 大志朗, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 アシルイミニウムカチオンを経由したペプチド主鎖修飾反応の開発
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 傳田 将也, 野中 智貴, 小林 大志朗, 林 隼矢, 安田 拓真, 光村 豊, 原田 範雄, 稲垣 暢也, 大高 章
2. 発表標題 S-保護システインスルホキシドを利用したトリプトファン選択的修飾法の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第17回年会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 左東 大輝, 篠崎 千穂, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 ユビキチン化の機能解明を志向した新規スレオニン側鎖アシル化法の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第17回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲月 勇斗, 辻 貴志, 小林 大志朗, 林 隼矢, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 Cysteinyl Prolyl Esterシステムを利用した新規医薬品放出制御システムの開発研究
3. 学会等名 第62回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田 りか, 左東 大輝, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 刺激応答性機能変換ペプチドの新規合成法の開発
3. 学会等名 第62回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 大志朗, 林 隼矢, 日高 功太, 光村 豊, 大川内 健人, 傳田 将也, 大高 章
2. 発表標題 Interrupted Pummerer反応によるTrp選択的修飾を利用したOne-potペプチドヘテロ二量化法の開発
3. 学会等名 第49回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daishiro Kobayashi, Junya Hayashi, Kohta Hidaka, Ohkawachi Kento, Yutaka Kohmura, Masaya Denda, Akira Otaka
2. 発表標題 TRYPTOPHAN-SELECTIVE PEPTIDE MODIFICATION USING S-ACETAMIDEMETHYL PROTECTED CYSTEINE SULFOXIDE UNDER MILD ACIDIC CONDITION AND ITS APPLICATION TO PEPTIDE HETERODIMERIZATION
3. 学会等名 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daishiro Kobayashi, JUNYA Hayashi, Kohta Hidaka, Ohkawachi Kento, Yutaka Kohmura, Masaya Denda, Akira Otaka
2. 発表標題 Protein tryptophan modification enabled by using S-protected cysteine sulfoxide under mild acid conditions
3. 学会等名 13th International Peptide Symposium 15th Australian Peptide Conference
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学薬学部 機能分子合成薬学分野 <a href="https://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/syn/">https://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/syn/</a>
---

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