

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15303

研究課題名（和文）癌細胞特異的に発現するAspHを標的とした難治性癌有効な抗癌剤シード化合物の探索

研究課題名（英文）Searching for effective anti-cancer seed compounds for refractory cancers targeting AspH

研究代表者

中嶋 優（Nakashima, Yu）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：60902038

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）：富山大学和漢医薬学総合研究所が有する160種類の生薬抽出液および漢方方剤抽出液のライブラリーに対して、アスパラギン酸水酸化酵素（AspH）を標的とした阻害活性試験を実施した。阻害活性スクリーニング試験では、複数の生薬、および漢方方剤抽出液が、濃度依存的にAspHの阻害活性を示すことが判明した。引き続き、AspH阻害活性を示す化合物を複数単離した。特に強いAspH阻害活性を示す天然物に対しては、AspHとの共結晶化を試みた。X線結晶構造解析の結果、天然物のAspH阻害活性機構の解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究では複数の生薬や漢方方剤がAspH阻害活性を示すことを初めて明らかとした。さらに、その阻害活性を示す天然物の単離に成功することで、天然阻害剤のAspH阻害活性メカニズムの解明を化合物ベースで行う基盤構築を行なった。それに加え、AspH-天然阻害剤の複合体構造をX線結晶構造解析の手法により取得することに成功し、天然阻害剤のAspH阻害活性機構を明らかとした。AspH-天然阻害剤の複合体構造の取得には前例がなく、今後は得られた複合体X線結晶構造の阻害剤結合様式に基づき、天然阻害剤の官能基変換等を有機合成的に行うことで、AspHへの阻害活性や選択性を向上した阻害剤の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：AspH inhibitory activity tests were conducted on a library of 160 crude drug extracts and Chinese herbal medicine extracts held by the Institute of Natural Medicine at the University of Toyama. In the screening test for inhibitory activity, several crude drug and herbal medicine extracts were identified to exhibit AspH inhibitory activity in a concentration-dependent manner. In this study, natural compounds showing AspH inhibitory activity were isolated. Subsequently, co-crystallisation with AspH was conducted for natural products showing robust AspH inhibitory activity. The results of the X-ray crystallographic analysis successfully elucidated the mechanism of the AspH inhibitory machinery of the natural inhibitors.

研究分野：天然物化学

キーワード：AspH 20G依存性酸化酵素 生薬 阻害剤

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近では、癌の新たな治療法の開発も進み、本邦における5年相対生存率は、癌全体では64.1%まで上昇した。前立腺癌や女性乳癌、皮膚癌においては、その生存率が92%以上に達している。一方、癌による5年相対生存率を発症部位別に見てみると、肝臓癌と肺癌による生存率は未だ4割台、胆嚢癌では未だ3割台である。さらに、膵臓癌に至っては約8.5%と極端に低く、これらの難治性癌に対する新たな治療法の開発が依然として重要な課題となっている。特に、早期発見・治療切除困難な症例が多い膵臓癌は、術後早期に再発し予後不良であることが多いため、有効な薬剤の早期開発が求められている。これまでに、これらの難治性癌に対する治療薬の標的分子として、種々の候補が報告されている。これらの中で、AspHは、Notch経路において、Notch受容体やそのリガンドに見られる上皮成長因子(EGF)様ドメインのアスパラギン及びアスパラギン酸を水酸化する2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ(2OGX)である。Notch経路は、神経、血液、免疫系などの多くの組織の発生や恒常性維持の重要な役割を担っている細胞間のシグナル伝達経路であり、癌細胞に見られる特異的経路ではない。一方、近年の研究により、AspHは、通常の細胞ではほとんど発現していないにもかかわらず、一般的に低酸素状態の傾向にある癌細胞においては大量に発現し、Notch経路を活性化することで、発癌や癌細胞の増殖、癌転移に深く関わっていることが明らかになった。AspHの過剰発現は、膵臓癌、肝細胞癌、大腸癌などの悪性腫瘍において確認されている。既に、Notch受容体の細胞内ドメインと細胞外ドメインの結合を切断することでNotch経路の活性化を担うγ-セクレターゼの阻害剤MK-0752が医薬品候補として臨床試験に移っている。しかし、γ-セクレターゼは癌細胞に限らず、正常細胞においても恒常的にNotchシグナル系で発現するタンパク質である。よって、癌細胞のみならず、正常細胞の機能低下を招く副作用が強く懸念される。患者の闘病生活におけるクオリティ・オブ・ライフの改善は、現代の医療における重要な課題の一つである。AspHは、正常細胞での発現量が低い一方で癌細胞に過剰発現する酵素であることから、癌細胞選択的かつ正常細胞に対して副作用のない難治性癌にも有効な新たな抗癌剤の開発に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、天然資源等からAspHに対する阻害剤を探索し、かつ、それらとAspHとの複合体結晶構造から阻害作用機序を明らかにして新たな抗癌剤リード候補を取得することを目的とする。さらに、得られた天然阻害剤とAspH複合体構造を基にして天然物の部分構造を改変させ、より阻害活性の高い化合物の有機合成を目指す。本研究の特徴は、後述する申請者のこれまでの2OGXの結晶構造解析と阻害剤の開発に関する経験を基にして、天然資源からAspH特異的阻害剤を見出し、AspHとの複合体結晶構造解析を通して、AspHを標的とした新規癌治療薬リードの開発を目指す点にある。天然資源には、ヒトが容易に模倣できない人知を超えた斬新さと複雑な構造を有する天然物が含まれている。これら天然資源からの阻害剤探索は、計算科学や構造スペクトルに限られた合成ベースの化合物ライブラリーよりも2OG結合部位と異なる未知の部位に結合して阻害効果を示す天然化合物の発見に繋がることが十分に推測される。さらに、AspHの立体構造を基にし、本研究で見出したAspHに対してアロステリック効果を示す化合物とAspHの活性中心キャビティーへの競合的阻害活性を示す化合物が、リンカー等を通して結合することで強力かつAspH特異的な阻害剤の開発に繋がると期待できる。酵素特異的な阻害剤開発は、副作用の軽減が期待され、医薬品開発の側面からも非常に重要である。また、本研究の手法は、AspH以外の他のヒト由来2OGXへの応用も可能であり、その発展性も極めて高い。天然物化学と構造生物学を融合した本研究課題は、創薬の一端を担う意義の高い成果が得られると期待できる。

3. 研究の方法

富山大学和漢医薬学総合研究所は、160種類の生薬抽出液及び漢方方剤抽出液のライブラリーを有する。本研究では、これらを活用し、有機溶媒抽出物について、AspH阻害活性試験を実施し、次に、各種ライブラリーの活性評価に基づき、大スケールの抽出物を調整した後、各種クロマトグラフィーを用いて阻害活性を指標として化合物を単離し、NMR等の各種スペクトル分析により化学構造を決定する。AspH阻害活性試験では、簡易的かつハイスループットな定量的評価が可能な96ウェルプレートを用いた比色法による活性試験を実施する。AspHは、2OGを共基質として利用してコハク酸を放出する。本評価法は、放出したコハク酸をATP存在下でサクシニルCoA合成酵素と反応させることで生成する無機リン酸を定量的に評価するものであり、市販のキットを利用してAspH阻害活性を示す化合物とその競合的阻害等の阻害様式を明らかにする。AspHは、大腸菌にHisタグとの融合タンパク質としてAspHを異種発現させ、Ni-NTAアフィニティークラム、サイズ排除クロマトグラフィーを用いた多段階精製にて調整する。AspH阻害活性を示

す化合物については、ヒト膵臓癌細胞 PANC-1 やヒト肝癌細胞 HepG2, ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549, ヒト大腸癌細胞 HPS, ヒト由来通常細胞への細胞毒性を評価し, 癌細胞への効果や通常細胞への毒性の検討を図る。本研究で見出した天然阻害剤は, Oxford 大学の Schofield 先生に RapidFire による詳細な阻害活性試験を依頼する。AspH に対して阻害活性を示した化合物については, AspH との複合体 X 線結晶構造を取得する。本研究で扱うヒト由来 AspH は, 既に複数の結晶構造が報告されている。そこで, それらの条件について, 共結晶化やソーキング法を試みて複合体結晶構造の取得を狙う。これらの方法で結晶が得られない場合には, 市販の結晶化スクリーニングキットを用いて複合体結晶を得た後, 放射光にて X 線解析データを取得して各化合物の相互作用様式を解明する。

4. 研究成果

富山大学和漢医薬学総合研究所が有する 160 種類の生薬抽出液および漢方方剤抽出液のライブラリーに対して, AspH 阻害活性試験を実施した。はじめに, 阻害活性試験に使用するアッセイ系の構築を行った。AspH は酵素反応により 2-オキソグルタル酸(2OG)をコハク酸へ変換することが知られている。つまり, 試料中に AspH 阻害剤が存在する場合はコハク酸の生成量が低下する。そこで, コハク酸の生成量を可視化するアッセイ系の構築を以下の 3 つの反応系により行った。

1. AspH の基質である EGF1、共基質である 2OG および補因子である鉄イオンとアスコルビン酸を使用し, AspH に対する一次反応を実施する。
2. 一次反応の反応生成物であるコハク酸を, ATP および CoA の存在下で Succinyl-CoA Synthetase(SCS)によって Succinyl-CoA に変換する二次反応を実施する。
3. Malachite Green Phosphate Assay Kit を使用して, 二次反応で放出されたモノリン酸を検出する三次反応を実施し, 620 nm の吸光測定によるモノリン酸濃度依存的な検出を行う。

EGF1 は AspH の基質認識において必須の 39 残基のペプチドとして, 異種大腸菌にて大量発現および多段階精製によって高純度化した。同様に, AspH および SCS も 異種大腸菌による大量発現および多段階精製により高純度化した。上記の阻害活性スクリーニング試験では, 複数の生薬, および漢方方剤抽出液が, 濃度依存的に AspH の阻害活性を示すことが判明した。

引き続き, 特に阻害活性の強い生薬に関して, 市販の各 2 kg の乾質量の生薬に対する有機溶媒による抽出およびシリカカラムを用いた精製を AspH 阻害活性に基づき実施した。単離に成功した AspH 阻害活性を示す天然物に対して, NMR および MS を用いて構造決定を行なった。これらの天然阻害剤に対して, 測度論的な解析を行うことで, 共基質である 2OG と競合して阻害する化合物や基質である EGF1 と競合して阻害する化合物に二分されることが判明した。特に強い AspH 阻害活性を示すいくつかの天然物に対しては, AspH との共結晶化を試みた。その結果, 複数の条件下において AspH 結晶の取得に成功した。引き続き, X 線結晶構造解析を実施した結果, AspH-天然阻害剤の複合体構造の取得に成功した。具体的には, 天然阻害剤が 2OG や EGF1 の認識サイトに結合する様子が確認され, AspH 阻害活性機構の解明に成功した。現在, これらの成果に対する論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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