

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460164

研究課題名(和文)多機能性酵素プラスミンに対する活性中心志向型阻害剤の分子設計

研究課題名(英文)Studies on the active site-directed plasmin inhibitor: It may control plasmin having multifunctional properties

研究代表者

津田 裕子 (TSUDA, YUKO)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：10098478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：プラスミン(PL)は線溶系の中心的酵素であり、その阻害剤は止血剤として使用されてきた。PLは線溶系以外の系の種々タンパク質を分解し、ガンの転移や浸潤、炎症性疾患に関わっていることが示唆されている。本研究で、我々はPL阻害剤がマウスにおける炎症を和らげ生存率を改善することを示した。また従来からあるPL阻害剤の構造を変換してより強力なPL阻害剤を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Plasmin (PL) plays a dominant role in the fibrinolysis pathway so that PL inhibitors have been used as a hemostatic agent. Additionally, PL is activated in specific regions of the extracellular milieu to digest many proteins on the localized cell surface resulting in inducing cell invasion and metastasis and alternating the expression of cytokines. In this work, we disclosed 1) PL inhibitor (Y0-2) attenuated both aGVHD- and colitis-associated lethality in mice; 2) more potent and selective PL inhibitor was obtained.

研究分野：医薬品化学

キーワード：プラスミン 阻害剤 活性部位指向型 炎症性疾患治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) プラスミン(PL)の機能について

プラスミン(PL)は血栓の除去に関わる線溶系において中心的役割を果たす酵素としてよく知られている。PLの異常亢進による病態は大量出血であり、その治療にはトラネキサム酸(Tra)が汎用されている。しかし、PLは線溶系のみならず、他の系のタンパク質を分解することにより様々な病態に深く関わっていると認識されつつある状況であった。

### 2) 新規 PL 阻害剤開発の意義

活性化されたPLは血液中の $\alpha_2$ -アンチプラスミン( $\alpha_2$ -PI)により捕獲され抑制されるが、制御が外れPLの異常亢進がおこると大量出血にいたる。大量出血にはアプロチニンが効果的に使われてきたが、アナフィラキシー等の副作用が報告され臨床利用の頻度が減少し、Traが汎用されている。しかし、Traの止血作用はアプロチニンと比較すると弱く、大量の投与が必要という問題点を抱えている。加えて、TraはPLの活性中心に結合するのではなく、フィブリン(またはフィブリン-ゲン)上のリジン結合部位(LBS)に結合して、PLを阻害している。従って、種々タンパク質を分解する「多機能性」PLの制御のためには、活性中心に直接結合してPLを制御する新規PL阻害剤の開発が望ましいと考えた。

### 3) Y0-2の発見

このような状況下、申請者らはPLに特異的な活性中心志向型PL阻害剤Y0-2を報告した(*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, 10, 2217-2221; *In vivo*, 2002, 16, 281-286)。Y0-2はPLを $IC_{50}$ 値 $0.53 \mu M$ で阻害し、血漿カリクレインに対して56倍、ウロキナーゼに対して10倍、トロンピンに対して800倍の特異性を示した。この阻害は合成基質S-2251を使用した実験から求められたことから、Y0-2はLBSではなく活性中心に直接結合してPLを阻害していることが示唆された。なおY0-2はTra、 $\alpha$ -Picolyyl-L-tyrosine、*n*-octylamineの3つの部分から構成されている。

## 2. 研究の目的

申請者は本研究において、PLの「多機能性」に注目し、特にa)PLによるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の活性化によるガンの組織内浸潤および転移、b)サイトカインの活性化による炎症の発症、といった病態時のPLの役割の解明、ならびに病態の改善を目的として、新規PL阻害剤の分子設計ならびに合成研究を立案した。

## 3. 研究の方法

Y0-2のTra、 $\alpha$ -Picolyyl-L-tyrosine、*n*-octylamineの3つの部分はPL側のそれぞれS1、S2、S1'部位と相互作用していることを、ドッキング手法による解析により、我々は既に明らかにしていた。本実験では1)P1、P2、P1'残基をそれぞれシステマティックに

置換し、構造の最適化を図った。P1ならびにP1'の置換は主に津田が担当し、P2の置換は主に日高が担当した；2)分子の置換は、研究協力者(合田圭吾ら/関西分子設計研究会)とともに複合体の三次構造を検討しながら進めた；3)PLならびに他種酵素の阻害活性は研究協力者(和中敬子ら/血栓止血神戸プロジェクト)ともに行い、その過程で新規PL基質をも開発した；4)得られた化合物中、最も強く選択的にPLを阻害した化合物とミクロPLの複合体の結合様式についてX線解析(Dr. Ruby Law, Monash University)により検討した。ドッキングによる解析も行い、結合様式を比較した。5)炎症発症動物を用いた検討は研究協力者(服部浩一ら/東京大学医科学研究所、現順天堂大学)ともに行った

## 4. 研究成果

P2残基をより大きな分子に拡張することにより、より強力に選択的なPL阻害剤が得られたので、報告する。残念ながら、P1およびP1'残基の置換は強力なPL阻害剤を生み出すには至らなかった。

### 1) 活性位中心近傍領域の構造の考察

活性位中心近傍領域のX構造解析の結果より、PLのS2部位がウロキナーゼなど他のセリン酵素と比較して広く広がっていることが観察された(図1)。

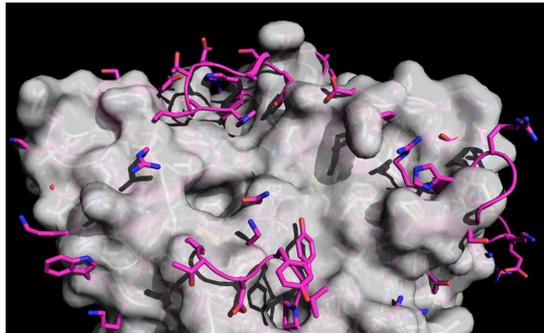


図1. PL (1BML, white surface) とウロキナーゼ(1FV9, purple wire)の活性中心近傍の構造比較

このことから、P2残基Tyrの水酸基にピコリル基より大きい分子を導入してもPLは許容できるが、一方ウロキナーゼは許容できないため、結果としてPLに選択的な阻害剤が得られると推測した。次項に合成した化合物の構造を示す(図2)。

### 2) P2残基の最適化

合成した化合物の中で、ピリジン環をキノリン環に置換した化合物17が最も強いPL阻害活性を示した( $IC_{50} = 0.22 \mu M$ )。これはY0-2( $IC_{50} = 0.53 \mu M$ )より2.4倍強力にPLを阻害し、ウロキナーゼとの選択性は35倍向上した。このことにより、P2残基の伸長は阻害活性と選択性の向上に有用であることが示された(図3)。



査読有

Tsuda Y, Hidaka K, Gohda K, Teno N, Wanaka K. Plasmin specific inhibitors: Additional interaction at the S2/S3 and S' 1 sites. *Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium*, **2014**; 244-45. 査読無

Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Shimazu H, Munakata S, Yagita H, Okumura K, Tsuda Y, Okada Y, Tojo A, Nakauchi H, Takahashi S, Beate Heissig, and Hattori K. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. *Leukemia*. **2015**, 29(1), 145-56. doi: 10.1038/leu.2014.151. 査読有

Munakata S, Tashiro Y, Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahri D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B, Hattori K. Inhibition of Plasmin Protects Against Colitis in Mice by Suppressing Matrix Metalloproteinase 9-Mediated Cytokine Release From Myeloid Cells. *Gastroenterology*. **2015**, 148, 564-578. doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.001. 査読有

Suzuki A, Hidaka K, Gohda K, Teno N, Wanaka K, Tsuda Y.: plasmin inhibitors: Replacement of the P2 and P1' residues *Peptide Science 2014; Proceedings of the 51st Japanese Peptide Symposium*, Edited by Otaka, A, The Japanese Peptide Society, **2015**, Minoh, 209-210. 査読有

津田裕子、日高興土(総説) 活性中心指向型プラスミン(PL)阻害剤の探索. *化学工業*, **2014**, 65(11), 51-56. 査読無

Teno N, Gohda K, Wanaka K, Tsuda Y, Akagawa M, Akiduki E, Araki M, Masuda A. T. Otsubo T, Yamashita Y. Novel type of plasmin inhibitors: Providing insight into P4 moiety and alternative scaffold to pyrrolopyrimidine. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 3696-3704. doi: 10.1016/j.bmc.2015.04.013. 査読有

Hidaka K, Gohda K, Teno N, Wanaka K, Tsuda Y. Active site-directed plasmin inhibitors: Extension on the P2 residue. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 545-553. doi: 10.1016/j.bmc.2015.12.0009. 査読有

Kusano M, Hidaka K, Gohda K, Teno N, Wanaka K, Tsuda Y.: Design of plasmin inhibitors targeting the S1' subsite. *Peptide Science 2015; Proceedings of the 52nd Japanese Peptide Symposium*, Edited by Hojo, Y, Monoh, The Japanese Peptide Society **2016**, 143-144. 査読有

〔学会発表〕(計 15件)  
岡部未奈子、日高興土、合田圭吾、手納直規、和中敬子、津田裕子: プラスミン(PL)選択的阻害剤を目指して～結合ポケットの比較からデザインする. 第18回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2013年8月16日・17日、吹田、千里ライフサイエンスセンター.

津田裕子: 活性中心志向型プラスミン阻害剤の探索. 生命分子機能研究会2013学術集会. 2013年9月19日・20日、長浜、長浜バイオ大学.

Atsumi S, Hidaka K, Gohda K, Teno N, Wanaka K, Tsuda Y: Search for plasmin specific inhibitors: Extension on the P2 residue. 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/50th Japanese Peptide Symposium 6th-8th November, 2013, Suita.

渥美沙紀、松井千紗、日高興土、合田圭吾、手納直規、和中敬子、津田裕子: P2残基置換によるプラスミン阻害剤の構造活性相関. 日本薬学会134年会, 2014年3月28日～30日、熊本.

前原いつか、松井千紗、村上弥生、日高興土、合田圭吾、手納直規、和中敬子、津田裕子: プラスミン(PL)選択的阻害剤を目指して～P1'残基の構造変換. 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2014年8月8日・9日、吹田、千里ライフサイエンスセンター.

Tsuda Y, Hidaka K, Gohda K, Teno N, Wanaka K.: Plasmin specific inhibitors: Additional interaction at the S2/S3 and S' 1 sites. The 33rd European Peptide Symposium. August 31st-September 5th, 2014, Sofia, Bulgaria.

Okada Y, Wanaka K, Tsuda Y.: Development of active center-directed plasmin inhibitors. The 15th Akabori Conference/Japanese-German Symposium on Peptide Science. September 7th-September 10<sup>th</sup>, 2014, Boppard, Germany.

Suzuki A, Hidaka K, Gohda K, Teno N, Wanaka K, Tsuda Y.: Study on the plasmin inhibitors: Replacement of the P2 and P1' residues. The 51<sup>st</sup> Japanese Peptide Symposium, October 22<sup>nd</sup>-24<sup>th</sup> 2014,

Tokushima.

草野真衣、日高興士、合田圭吾、手納直規、和中敬子、津田裕子: 活性中心指向型プラスミン阻害剤の長鎖 P1' 残基導入による構造活性相関. 第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2015 年 8 月 21 日・22 日、名古屋、ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋.

Law R.H.P., Quek A.J., Wu G., Conroy P.J., Hidaka K., Carad-Duek T. Tsuda Y., Whisstock J. C.: Structural studies on plasminogen activation and plasmin inhibition. The 9th General Meeting of International Proteolysis Society (Golden Sans Hotel Conference Center), Peneng, Malaysia, Oct 4-8, 2015.

Wu G., Hidaka K., Jeevarajah D., Tsuda Y., Whisstock J. C., Law R.H.P.: The x-ray crystal structure of microplasmin with a small-molecular active site inhibitor PSI-112. The 9th General Meeting of International Proteolysis Society (Golden Sans Hotel Conference Center). Peneng, Malaysia, Oct 4-8, 2015.

Kusano M, Hidaka K., Gohda K, Teno N, Wanaka K, Tsuda Y.: Design of plasmin inhibitors targeting the S1' subsite. The 52nd Japanese Peptide Symposium. 16th -18th November 2015, Hiratsuka.

山下ユキコ, 合田圭吾, 大坪忠宗, 和中敬子, 津田裕子, 手納直規: 新規プラスミン阻害剤への展開: pyrrolopyrimidine scaffold から benzimidazole scaffold への変換. 第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 2015 年 11 月 25 日~27 日、幕張国際研修センター.

Kusano M, Suzuki A, Hidaka K., Gohda K, Teno N, Wanaka W, Tsuda Y.: Active site directed plasmin inhibitors: modification on P1' residue. 7th International peptide symposium 2015. 9th-11th December 2015, Singapore.

村本凌太郎、日高興士、合田圭吾、手納直規、和中敬子、津田裕子: S1 サブサイトを標的としたプラスミン阻害剤の探索. 日本薬学会 135 年会. 2016 年 3 月 26 日~28 日、横浜.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ [URL:www.kobegakuin.ac.jp/information/public/teacher/pharcy/](http://www.kobegakuin.ac.jp/information/public/teacher/pharcy/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 裕子 (YUKO TSUDA)  
神戸学院大学・薬学部・教授  
研究者番号: 10098478

(2) 研究分担者

日高 興士 (KOUSHI HIDAKA)  
神戸学院大学・薬学部・講師  
研究者番号: 30445960

(3) 連携研究者: なし