

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750384

研究課題名(和文) Cortistatin Aの標的分子同定と抗がんリード化合物創製への展開

研究課題名(英文) Target identification of cortistatin A and development of anti-cancer drug lead

研究代表者

古徳 直之 (Kotoku, Naoyuki)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20362618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生阻害作用を有する海洋天然物cortistatin Aの標的分子同定を目指して、すでに開発済みの構造単純化アナログ化合物由来のアフィニティプローブ分子を用いたプルダウンによって結合タンパク質の同定、解析を検討し、その絞り込みに成功した。また、同アナログ化合物を短工程、高収率で合成できる第二世代合成法の確立に成功したので、これを用いた構造最適化を検討した結果、天然物に匹敵する強力かつ高選択的な血管新生阻害作用を有する有望なリード化合物を見出し、in vivoでも顕著な抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Target identification study of cortistatin A, a highly potent and selective anti-angiogenic substance from marine sponge, was executed. Using an affinity probe molecule derived from a structurally simplified analogue compound that was developed by our group, chemical pulldown from cell lysate of endothelial cells was examined. After several attempts, we purified and identified some candidates of the target molecule using a photoaffinity probe molecule affinity probe molecules and LC-MS/MS analyses.

We also developed a second-generation synthetic method of the analogue compound, which allowed us to prepare various analogues with ease. Optimization study resulted in generating a promising lead compound, which showed potent and selective growth inhibitory activity against endothelial cells comparable to the natural cortistatin A. Moreover, it also exhibited significant in vivo anti-cancer effect upon oral administration.

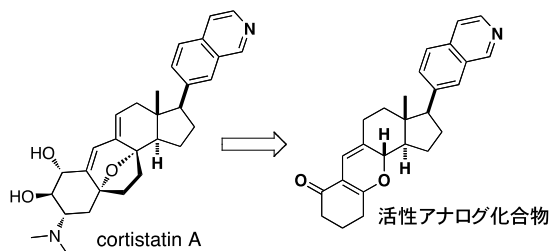
研究分野：天然物有機化学

キーワード：活性発現の分子機構 海洋天然物 抗がんリード化合物

1. 研究開始当初の背景

近年、がんの『分子標的治療』の概念が広がり、固形がんの進行と密接に関わっている血管新生を阻害する薬剤の開発が精力的に進められてきた結果、これまでに数種の薬剤がすでに上市されている。これらはいずれも代表的な血管新生促進因子の一つである VEGF のシグナル伝達を阻害するものであるが、十分な治療効果が得られていない現状に加え、副作用の問題などもあり、新たな作用メカニズムを有し、十分な治療効果が期待できる薬剤の開発が求められている。こうした背景下、我々は、ヒト血管内皮細胞に対する選択的増殖阻害活性を指標として、海綿類を中心とする底生海洋生物の抽出エキストラブライから新規な血管新生阻害物質を探索し、非常に特異な新規アルカロイド cortistatin 類を見いだしている (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3148.)。主活性成分である cortistatin A は、血管内皮細胞(HUVEC)の増殖を強力に阻害($IC_{50} = 1.8 \text{ nM}$)し、他の細胞と比較して数千倍の選択性を示すことから、新規抗がん剤シーズとして非常に魅力的な化合物であるが、天然から極微量しか単離できないため、化合物の供給には化学合成が不可欠である。多くの研究グループにより活発に全合成研究が進められているもの (Review: *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2900)、複雑な骨格の構築には多工程を要し、数ミリグラムの全合成にとどまっている。我々も以前より本化合物の全合成研究に着手しており、最近、7-endo 選択的分子内 Heck 反応と続く分子内 oxy-Michael 反応による B 環部の構築を鍵工程とする、cortistatin A の主炭素骨格の新規構築法を見いだしている (*Org. Lett.* **2011**, *13*, 3514) が、天然物そのものの全合成による供給は今なお困難である。

こうした背景下、我々は、天然類縁体の構造活性相関の知見をもとに、活性を保持しつつ短工程で合成可能なアナログ化合物の合成研究を行い、ごく最近、10 工程あまりで大量合成が可能であり、300 倍という高い HUVEC 選択的増殖阻害活性($IC_{50} = 35 \text{ nM}$)を有する化合物を見いだした。また、本化合物が腫瘍移植モデルマウスに対して経口投与で顕著な *in vivo* 抗腫瘍活性を示すことも明らかにしている (PCT 出願済み、*ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 673)。



しかし、ランダムな類縁体合成によるトライ & エラーを繰り返した結果として得られ

たものであり、本化合物の創製には多くの時間と労力がかかった。よって、活性天然物を凌ぐ活性を有する強力な活性を示す医薬リード化合物の創製には、活性物質の標的分子を明らかにし、その構造から論理的に設計・合成することが重要である。これまでの生化学的な検討から、cortistatin A は VEGF のシグナル伝達を阻害しないことを明らかにしているが、既存の血管新生阻害剤とは異なる作用メカニズムを有する新たな医薬リードへ展開させるためにも、その標的分子の同定は重要かつ喫緊の課題である。

生物活性物質の標的分子を明らかにする最も直接的かつ有効な方法は、活性物質由来のアフィニティープローブ分子を合成し、これを用いて選択的に結合するタンパク質を捕捉するケミカルプルダウン法である。我々は最近、タンパク質とより強固に相互作用するための捕捉補助基としてボロン酸をプローブ分子に組み込むと、そのルイス酸性により可逆的な共有結合を形成し、標的タンパクとの親和性が強固になり、捕捉能が顕著に上昇することを見いだす (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4152) など、標的分子同定の効率化を指向したケミカルバイオロジー研究を展開しており、今回、それらの技術を応用することにより、cortistatin 類に関する上述の課題を解決し、実用的な抗がんリード化合物創製への道を切り開くことができると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

海洋天然物 cortistatin A をモチーフにして開発した、経口投与で顕著な *in vivo* 血管新生阻害作用および抗腫瘍活性を示す有用なアナログ化合物を、さらに真に実用的な抗がんリード化合物へと展開することを目指し、本研究課題では、以下の研究目標を設定した。

高い選択性を有する cortistatin A アナログ由来のアフィニティープローブ分子を合成し、これを用いたプルダウンアッセイから cortistatin A の標的タンパク質を同定する。

化合物供給を指向した合成法のさらなる改善とともに、標的タンパク質の情報を考慮した分子設計・合成による構造最適化を行うことで、これまでのアナログ化合物よりもさらに優れたリード化合物の創製に向けた研究を推進する。

3. 研究の方法

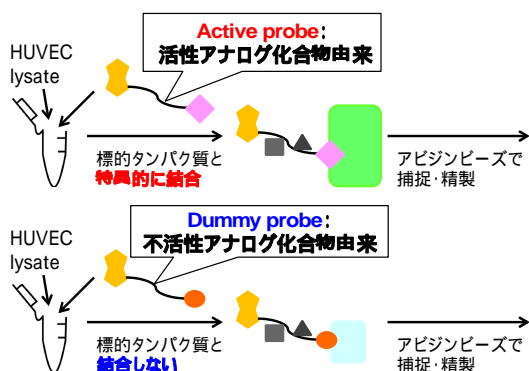
1. Cortistatin A の結合タンパク質の同定

上述のように、天然からの化合物の補給はほぼ不可能となっていること、全合成による供給も困難を極めることから、天然物そのものを用いた作用メカニズムの解明研究は現時点で難しい。そこで、我々が開発した、300 倍の高い選択性を有するアナログ化合物を

用いて、その結合タンパク質を明らかにすることとした。すなわち、開発したアナログ化合物由来のプロープ分子を合成し、これを用いて血管内皮細胞の破碎液からプルダウンアッセイを行うことで、結合タンパク質を精製し、質量分析等による同定を試みた。

活性物質の標的分子を特定するためには、プロープ分子に結合してきたタンパク質が、活性物質の構造を特異的に認識して結合したのか、疎水性相互作用等で非特異的に結合してきたものかを選別する必要があるが、以下の手法により絞り込みを検討した。

すなわち、活性アナログ化合物と類似の構造を持ちながら、HUVEC 選択的な増殖阻害活性を示さない、いわゆるダミー化合物由来のプロープ分子を用いたプルダウン実験との比較検討をはじめ、過剰量の活性アナログ化合物存在下でプルダウン実験を行う競合阻害実験等を行うことで、特異的に結合してきた真の標的分子を絞り込めると考えた。



一方で、リガンド部分だけでなく、プロープ分子のリンカー部分やプルダウンに用いるビーズにも非特異的に付着してくるタンパク質があるため、これを排除する目的で、プロープ分子のリンカー上に緩和な条件で化学的に切断が可能な化学構造 (cleavable site) を組み込んだプロープ分子の利用を検討した。従来用いられているジスルフィド結合などに加えて、Baker らの最近の報告 (*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1960) を参考に、新たな cleavable site としてプロモマレイミド基に着目した検討を行うことを計画した。これら cleavable site を有するプロープ分子を用いたプルダウンを行い、特異的に認識して結合した標的タンパク質のみを検出できるかどうか検討した。

上述した検討により絞り込みに成功した有望な候補タンパク質については、RNAi 法によって該当する遺伝子のノックダウン細胞株を作製し、cortistatin A 添加時と同様の表現形が現れるか否か、あるいは高発現株を作製して化合物に対する耐性を獲得するかを確認する等のケミカルジェネティクス的手法によって、真の標的分子を見出すことを試みた。

2. アナログ化合物の合成法の改良

標的タンパク質の同定研究と並行して、ア

ナログ化合物の構造最適化に向けた合成化学的な展開をより容易に行うことと、供給面の更なる改善を目的に、短工程で効率のよい合成法の確立についても検討することとした。すなわち、これまでに開発した合成ルートでも比較的容易に化合物の供給ができる体制を確立しているが、10 工程以上を要する直線的なルートであることに加え、イソキノリン側鎖の導入を早い段階で行うため、側鎖部分の構造変換が困難であるという欠点を抱えていた。特に C 環部の官能基変換に多工程を要していたので、これを改善することで、より優れた合成ルートの確立を目指した。

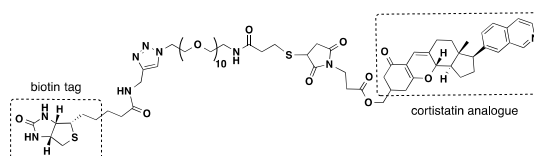
また、これまでとは別の原料を用いる合成法の開発についても検討した。従来は、市販の Hajos-Parrish ケトンを原料としていたが、ここから *trans*-hydrindane 骨格へ変換するためには厳密な温度管理のもとで立体選択的な還元反応を行う必要があるため、ステロイド骨格の合成研究において以前より原料に用いられている、ビタミン D₂ の酸化分解物を利用した合成法の確立についても検討した。

確立した合成法を利用して、より有効性の高い化合物の創製を目指す構造最適化研究も行うこととした。例えば、上述のアナログ化合物は脂溶性が高く、経口投与には CMC-Na による乳化分散が必要であるため、バイオアベイラビリティーの向上を意識して、極性官能基を有する A 環部および側鎖部分の導入による水溶性の向上を検討した。また、良好な活性を示す化合物については、腫瘍移植モデルマウスを用いた *in vivo* 試験も行い、その実用性を検証した。

4. 研究成果

1. Cortistatin A の結合タンパク質の同定

これまでの構造活性相関の解析から、活性発現に悪影響を及ぼす可能性が最も低く、合成の最終段階で変換できる A 環部に、プロープ分子へと誘導化する足がかりとなる水酸基を導入したアナログ化合物を合成した。これが HUVEC 選択的な増殖阻害活性を保持していたので、新たに確立した、各種プロープ分子を系統的に合成できる手法を用い、ポリエチレングリコール (PEG) リンカーを介してビオチン標識することでアフィニティープロープ分子を合成した。また、同様の手法にて、HUVEC 選択的な増殖阻害活性を示さないことをすでに見出している、ステロイド骨格にイソキノリン側鎖を連結したダミー化合物由来のプロープ分子もあわせて合成した。



そこでこれらを用いて、HUVEC の細胞破砕液からのプルダウンアッセイについて検討を行った。その結果、SDS-PAGE 上にて、活性アナログ化合物由来のプロープ分子に選択的に結合する 10 数種のタンパク質のバンドを見出すことに成功し、これらのうちのいずれかが cortistatin A の標的分子であることを示唆する結果が得られた。

これらのプロープ分子に結合してきたタンパク質を同定するため、(独)医薬基盤研究所の協力のもと、LC-MS/MS による網羅的な解析を行った。しかしながら、上述のプルダウン実験自身が、わずかな条件の違いで結果が変わってくる再現性の低いものであったことに加え、非特異的にプロープ分子に結合してくる種々のタンパク質の影響で LC-MS/MS による同定も満足いく結果が得られなかった。

上述の結果を踏まえ、標的タンパク質をより確実に捕捉することと、非特異的に吸着してくるタンパク質を排除して解析することを目的に、結合タンパク質と共有結合を形成することが出来る光反応性官能基を導入したフォトアフィニティープロープの利用と、プロープ分子のリンカー上に緩和な条件で化学的に切断が可能な化学構造 (cleavable site) を組み込んだプロープ分子の利用を検討した。

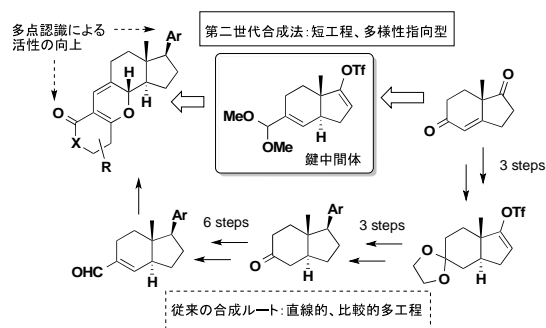
Cleavable site の導入については、当初導入を計画していたプロモマレイミド基が予想以上に不安定であることが判明し、合成とその後の機能評価が困難であったため適用を断念した。また、すでに利用例のある種々の cleavable site を導入して検討した結果、1,2-ジオールを過ヨウ素酸で切断する形が最も有効であることが分かったが、プルダウン実験に適用しても、得られてくるタンパク質の泳動パターンが劇的に改善されることはなかった。一方、フォトアフィニティープロープの利用によって、活性アナログ化合物由来のプロープ分子に選択的に結合するバンドを再現性よく得ることが出来るようになった。それらのうち、ダミープロープに結合せず、LC-MS/MS によって高スコアで同定され、かつ解析に十分な量のタンパク質を回収できたものを数種選別し、RNAi 法によって該当遺伝子のノックダウン細胞株を作製して、cortistatin A 添効時と同様の表現形、すなわち血管内皮細胞選択的な増殖阻害作用が現れるか否かを検討したが、有意な変化は観察されなかった。

以上のように、研究期間内に最終的な結論を出すには至らなかったものの、cortistatin A の標的タンパク質の候補をかなりの部分まで絞り込むことに成功した。今後の検討によって標的タンパク質を特定し、さらなる研究の展開につなげていきたい。

2. アナログ化合物の合成法の改良

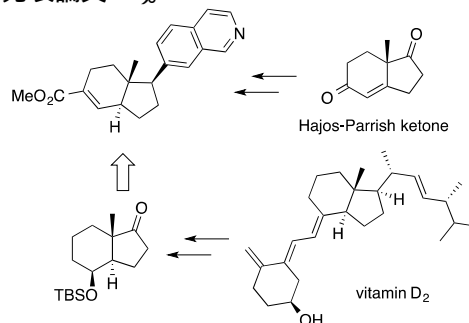
研究方法の項で述べたように、cortistatin A アナログの従来の合成法にはいくつかの問題点があったので、それらの改善を目指して改

良合成法の開発を検討した結果、最終的に、下図に示すような第二世代合成法の確立に成功した。



すなわち、市販の Hajos-Parrish ケトン为原料に用いることは従来と同じだが、変換の方法を変更することによって C 環部の構築が一挙に行えることを見出し、原料からわずか 4 工程で図中に示す鍵中間体を得ることができるようになった。ここから、イソキノリン側鎖と A 環部の導入を経て、全 7 工程での合成に成功し、総工程数を大幅に短縮 (14 工程 → 7 工程) することが出来た。これにより、特に側鎖部分の導入を合成の最終段階で行うことが可能となり、多様な誘導体を効率的に合成する体制を確立できた (論文投稿準備中)。

また、別の原料を用いる新たなアプローチとして、ビタミン D₂ の酸化分解物を利用した下図のような合成法の開発にも成功した (発表論文 2)。



これらの手法を用いて、種々構造を変換したアナログ化合物を合成し、活性評価を行ったところ、これまであまり重要ではないと考えていた A 環部を適切に変換することで、HUVEC に対する増殖阻害活性が大幅に向上することを見出した。イソキノリン側鎖と A 環部の官能基による多点認識が標的タンパク質との結合に重要な役割を担っていることを強く示唆する重要な知見であると考えている。

最も強力な活性を示した化合物は、天然物に匹敵する、HUVEC に対する強力 (IC₅₀ = 1 nM) かつ高選択的 (KB3-1 細胞との選択性が 5000 倍以上) な増殖阻害活性を示すこと、腫瘍移植モデルマウスに対して 1 mg/kg の経口投与で顕著な抗腫瘍活性を示すことを見出した。実用的な抗がんリード化合物としての

展開が期待される化合物であり、特許出願も視野に入れている。

また、イソキノリン側鎖の置換位置を7位から6位に変更するだけでHUVEC選択的な活性が完全に消失するという興味深い知見も得ることが出来た。これは活性アナログ化合物に極めて構造の類似しているダミー化合物として、今後の標的分子の絞り込みの際に利用できると考えている。

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 2件)

1. Kotoku, N.; Nakata, C.; Kawachi, T.; Sato, T.; Guo, X.; Ito, A.; Sumii, Y.; Arai, M.; Kobayashi, M. Synthesis and Evaluation of Effective Photoaffinity Probe Molecule of Furospinosulin-1, a Hypoxia-selective Growth Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *21*, 2102-2112. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.02.026
2. Kotoku, N.; Mizushima, K.; Tamura, S.; Kobayashi, M. Synthetic Studies of Cortistatin A Analogue from the CD-Ring Fragment of Vitamin D₂. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 1024-1029. DOI: 10.1248/cpb.c13-00375

[学会発表](計 6件)

1. 古徳直之、「実用的な医薬リード化合物の創製を指向した海洋天然物の合成化学研究」、日本生薬学会第62回年会、2015/9/11、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)(招待講演)
2. 古徳直之、伊藤葵、水野華奈子、渋谷俊一、小林資正、「Cortistatin A アナログ化合物の構造活性相関と標的特定への応用」、日本薬学会第135年会、2015/3/27、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県・神戸市)
3. 古徳直之、渋谷俊一、竹島亜季、角居雄太、伊藤葵、水野華奈子、小林資正、「Cortistatin A アナログの効率的合成法の開発」、第64回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014/10/11、京都薬科大学(京都府・京都市)
4. 伊藤葵、古徳直之、住井裕司、角居雄太、小林資正、「プローブ分子を用いたcortistatin A の標的分子の解析研究」、日本薬学会第134年会、2014/3/28、熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)
5. 伊藤葵、古徳直之、住井裕司、角居雄太、小林資正、「Cortistatin A の標的分子特定のためのプローブ分子の合成」、第63回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013/10/12、同志社女子大学薬学部(京都府・京田辺市)
6. 古徳直之、「創薬を指向した海洋天然物のケミカルバイオロジー研究」、日本薬学

会北海道支部第1回薬学の有機化学を考える会、2013/7/20、北海道大学薬学部(北海道・札幌市)(招待講演)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古徳直之(KOTOKU NAOYUKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：20362618

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：