

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460148

研究課題名(和文) 癌に関する亜鉛蛋白質を標的とした抗癌剤の創製

研究課題名(英文) Development of anticancer agents for zinc-proteins related to cancer

研究代表者

岡本 良成 (OKAMOTO, Yoshinari)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：20194409

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)：癌に関する亜鉛蛋白質の中で腫瘍細胞の転移に関するADAM17，細胞の増殖に関するRas蛋白質の翻訳後修飾に必須であるファルネシルトランスフェラーゼを標的とする新規抗癌剤の創製を目的とした。

ADAM17の阻害剤としては，50 μ Mの濃度でPro-TNF- α に対するADAM17の切断活性を完全に阻害し，分化誘導したTHP-1細胞に対するIC₅₀が3.22 μ Mの化合物を合成することができた。

ファルネシルトランスフェラーゼの阻害剤としては，Dansyl-GCVLSを基質とした阻害実験でIC₅₀が0.90 μ Mである化合物を合成することができた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that various proteins are relating to cancer. Among them, I focused on a disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) and farnesyltransferase (FTase).

We are successful to synthesis of a new pyridine /cysteamine based zinc chelator equipped with butyryloxybenzenesulfonyl group (as a ADAM17 inhibitor) or farnesyl group (as a FTase inhibitor) for recognition of these proteins.

IC₅₀ value of ADAM17 inhibitor against the THP-1 cell was 3.22 μ M, and IC₅₀ value of FTase inhibitor against the dansyl-GCLVS was 0.90 μ M.

研究分野：生体機能分子合成学

キーワード：癌 浸潤・転移 ADAM17 Rasタンパク 亜鉛配位子

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡の約90%は、腫瘍細胞の局所浸潤（周辺組織への浸潤）と遠隔転移によるものであると考えられている。近年、腫瘍細胞の浸潤・転移に、上皮間葉転移（EMT）に関連する転写因子Snailと、細胞の移動に関連してメタロプロテアーゼADAM10、およびADAM17が関与していることが見いだされた。また、細胞増殖シグナルに関与するファルネシルトランスフェラーゼ（FTase）は、多くの癌で変異型が見つかりがん細胞の異常増殖の原因となっている。

ADAM10やADAM17などのプロテアーゼやFTaseは、活性中心に亜鉛を持っており、亜鉛に作用する化合物は、これらの蛋白の活性を阻害することができると考えられる。MMPは、1990年代から癌治療の分子標的として認識され、その阻害剤（MMPi）の開発は活発な研究が行われているものの、その成功に行き着いたものはなかった。

研究代表者らは、ピリジンと2つのシステアミンからなる化合物が、亜鉛配位子として働き、亜鉛フィンガー蛋白質である HIV-EP1 に対して良い阻害効果を示すことを見いだした。さらに、この配位子のピリジン環の4位に芳香環を連結した化合物は、活性中心に亜鉛が存在し、その近傍に疎水性ポケットを持つファルネシルトランスフェラーゼの活性を阻害する事を見いだした。また、システアミン側鎖部位に広く MMP を阻害することが知られているマリマスタットの部分構造を導入した化合物は、細胞毒性を示さない濃度でがん細胞のフォーカス形成を阻害する事を見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発した亜鉛特異的な配位子に、蛋白質を特異的に認識する側鎖を結合し、これらの蛋白質の機能発現に必須である亜鉛と特異的に相互作用する亜鉛キレーターを設計・合成することを目的とした。ADAM17 阻害活性を持つ化合物は、癌の浸潤・転移を阻害する事により、また、FTase 阻害活性を持つ化合物は、がん細胞の異常増殖を抑えることでがん患者の QOL を改善する新しい抗癌剤の開発につながるものと考えた。

3. 研究の方法

ADAM17 阻害剤の合成は、4-ジメチルアミノピリジンを原料として、2 位へのホルミル基の導入、アセタール保護、6 位へのホルミル基の導入を順次行うことで得られる化合物に、キレート性側鎖であるシステアミンを還元的アミノ化により連結する。得られた化合物

物に対して、ADAM17 に特異的に結合することが知られているブチニルオキシフェニルスルフォニル基を ADAM17 認識部位として導入する。その後アセタールの脱保護を行い、生じたアルデヒドに対して、さらに一分子のシステアミンを還元的アミノ化により連結することで合成した。

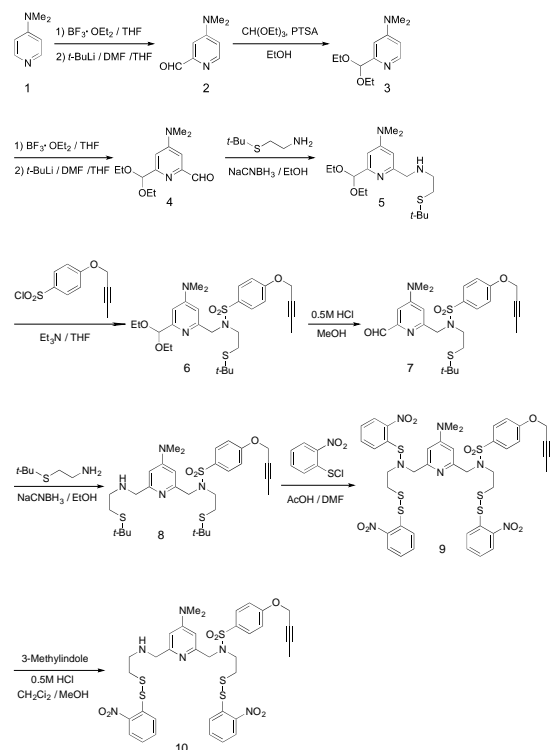
ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤の合成は、ケリダム酸を原料として、4 位のクロル化と 2,6 位のアルデヒド化に続く 4 位のアジド化、システアミンを用いたアジドの還元と 2,6 位のチアゾリジン化を行う。得られた化合物に対して、FTase 認識部位としてファルネシル基またはドデシル基を導入し、脱保護とチアゾリジン環の開環を行い、目的化合物を合成した。

合成した化合物は、ADAM17 や FTase に対する阻害活性を *in vitro*, *in vivo* で評価した。

4. 研究成果

(1) ADAM17 阻害化合物の合成

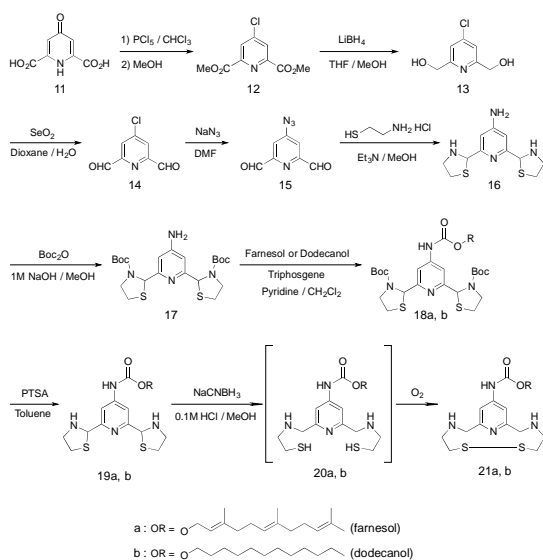
4-ジメチルアミノピリジンから 4 工程で得られた化合物 (5) に、ADAM17 認識部位としてブチニルオキシベンゼンスルホニル基を導入した後、6 位をシステアミン側鎖に変換した。チオール保護基である t-ブチル基をニトロフェニルスルフェニル基 (Nps 基) に置換した後、アミノ基の Nps 基を除去し目的化合物である化合物 (10) を得た。



(2) ファルネシルトランスフェラーゼ阻害化合物の合成

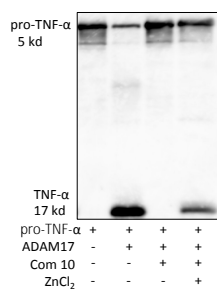
ケリダム酸から 6 工程で得られた化合物

(17) に、FTase 認識部位としてファルネシル基またはドデシル基を、トリホスゲンを用いることでカルバメートとして導入した。Boc 基の脱保護に続くチアゾリジン環の還元的開環により、目的化合物である化合物(20)が空気酸化された化合物(21)を得た。



(3) ADAM17 阻害剤の活性評価 *in vitro* 酵素阻害アッセイ

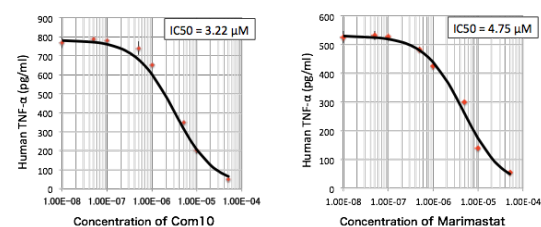
化合物(10)と ADAM17 と DTT をバッファーに溶かし 37 で 1 時間インキュベートした。その後、Pro TNF- を加えて 37 で一晩インキュベートし、Western Blotting により活性を評価した。その結果、50 μ M の濃度で ADAM17 の活性を完全に阻害することがわかった。また、化合物と同時に塩化亜鉛を加えた実験では、完全ではないものの ADAM17 の切断活性が回復した。この結果は、化合物(10)が ADAM17 の亜鉛に作用することで阻害活性を発現することを示唆するものである。



in vivo Pro TNF- 切断阻害活性

Moreila-Tabaka らの方法 (Plos ONE, 7, e34184 (2012)) に従い、THP-1 細胞を PMA により分化誘導し、化合物(10)を添加した。1 時間後に LPS で処理し、6 時間後に可溶性 TNF- を Western Blotting で定量した。その結果、化合物は濃度依存的に ADAM17 を阻害する事がわかった。ELISA を用いて IC₅₀ を求めたところ、3.22 μ M であった。同様の方法で ADAM17 を含む MMP を幅広く阻害する事

が知られている marimastat の IC₅₀ を求めたところ、4.75 μ M であった。



MTT アッセイ

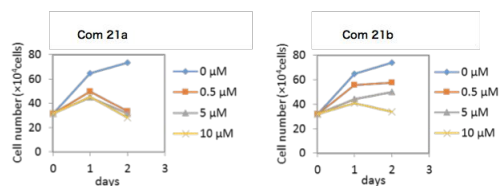
化合物(10)の細胞毒性を調べるために MTT アッセイを行った。その結果、10 μ M の濃度では、細胞毒性を示さないことがわかった。一方で、認識部位を持たない化合物では同濃度で細胞毒性が認められた。

(4) FTase 阻害剤の活性評価 *in vitro* 酵素阻害アッセイ

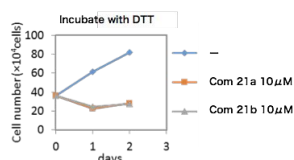
Pompliano らの方法 (Biochemistry, 31, 3800 (1992)) に従い、酵素としてヒト由来野生型 FTase、基質として Dansyl-GCVLS と FPP を用いて実験を行った。その結果、化合物(21a, b)は、濃度依存的に FTase を阻害する事がわかった。それぞれの化合物について IC₅₀ を求めたところ、ファルネシル基を持った化合物(21a)では 0.90 μ M、ドデシル基を持った化合物(21b)では 2.0 μ M であった。

細胞増殖阻害アッセイ

変異 K-Ras を発現している膵臓がん細胞 AsPC-1 細胞を 37 で 24 時間培養し、化合物(21a, b)を加えた。化合物を添加してから 24 時間後と 48 時間後の生細胞数をカウントした。その結果、どちらの化合物においても 24 時間後の時点では細胞数は増加していたが、48 時間後には細胞数は減少していた。これは、細胞内での化合物のジスルフィド結合の還元にかかるためではないかと考えられた。



そこで、培養液中に還元剤である DTT を加えて実験したところ、24 時間後においても細胞数の増加は観察されなかった。この結果は、化合物(21)のジスルフィド結合が還元を受けジチオール型になった後、FTase 阻害活性を発現していることを示唆するものである。



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5件)

Radwan Mohamed O., Sonoda Sachiko, Ejima Tomohiko, Tanaka Ayumi, Koga Ryoko, Okamoto Yoshinari, Fujita Mikako, Otsuka Masami, Zinc-mediated binding of a low-molecular-weight stabilizer of the host anti-viral factor Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G [*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24, (2016), 4398-4405] 査読有 . DOI: 10.1016/j.bmc.2016.07.030

Kamo Masahiro, Tateishi Hiroshi, Koga Ryoko, Okamoto Yoshinari, Otsuka Masami, Fujita Mikako, Synthesis of the biotinylated anti-HIV compound BMMP and the target identification study [*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, (2016), 43-45] 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.11.036

Ali Taha F. S., Iwamaru Kana, Ciftci Halil Ibrahim, Koga Ryoko, Matsumoto Masahiro, Oba Yasunori, Kurosaki Hiromasa, Fujita Mikako, Okamoto Yoshinari, Otsuka Masami et. al., Novel metal chelating molecules with anticancer activity. Striking effect of the imidazole substitution of the histidine-pyridine-histidine system [*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, (2015), 5476-5482] 査読有 , DOI: 10.1016/j.bmc.2015.07.044

Ida Satomi, Iwamaru Kana, Fujita Mikako, Okamoto Yoshinari, Kudo Yuri, Kurosaki Hiromasa, Otsuka Masami, L-Histidyl-glycyl-glycyl-L-histidine. Amino acid structuring of the bleomycin type pentadentate metal-binding environment capable of efficient double-strand cleavage of plasmid DNA [*Bioorganic Chemistry*, 62, (2015), 8-14] 査読有, DOI: 10.1016/j.bioorg.2015.06.007

Hiroshi Tateishi, Kensaku Anraku, Ryoko Koga, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka, Design and synthesis of lipid-coupled inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis-phosphate derivatives exhibiting high-affinity binding for HIV-1 MA domain [*Organic & Biomolecular Chemistry*, 12, (2014), 5006-5022] 査読有 . DOI: 10.1039/C4OB00350K

[学会発表](計15件)

加茂真宏,立石大,山本充奈美,岡本良成,森川裕子,三隅将吾,大塚雅巳,藤田美歌子,抗 HIV 剤 BMMP の作用機序解明 [日本薬学会第 137 年会], 2017 年 3 月 24 日~2017 年 3

月 27 日,東北大学(宮城県・仙台市)

本邑健太,岡本良成,古賀涼子,馬場菜々美,藤田美歌子,梅澤一夫,大塚雅巳,DHMEQ を基盤とした新しい生物活性物質の設計と合成,及び機能解析 [第 33 回日本薬学会九州支部大会], 2016 年 12 月 3 日~2016 年 12 月 4 日,鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)
Yoshinari OKAMOTO, Yasunori OBA, Ayumi TANAKA, Mika KAWABUCHI, Hiroshi TATEISHI, Mikako FUJITA, Masami OTSUKA, Development of Inhibitors for Zinc Proteins Related to Cancer [Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biochemical Sciences], 2016 年 10 月 2 日~2016 年 10 月 3 日,熊本大学(熊本県・熊本市)

Radwan Mohamed O., Sonoda Sachiko, Ejima Tomohiko, Tanaka Ayumi, Koga Ryoko, Okamoto Yoshinari, Fujita Mikako, Otsuka Masami, Zinc-mediated binding of a low-molecular-weight stabilizer of the host anti-viral factor APOBEC3G [252nd American Chemical Society National Meeting & Exposition], 2016 年 8 月 21 日~2016 年 8 月 25 日, Philadelphia (USA)

Ali TAHA, Taira Naomi, Koga Ryoko, Okamoto Yoshinari, Otsuka Masami, Fujita Mikako, Design and synthesis of small molecule HSP70 inducers [252nd American Chemical Society National Meeting & Exposition], 2016 年 8 月 21 日~2016 年 8 月 25 日, Philadelphia (USA)

加茂真宏,立石大,山本充奈美,岡本良成,森川裕子,大塚雅巳,藤田美歌子,抗 HIV 剤 BMMP の作用機序解明と活性改良 [日本薬学会第 136 年会], 2016 年 3 月 26 日~2016 年 3 月 29 日,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Mohamed RADWAN, Ryoko KOGA, Yoshinari OKAMOTO, Mikako FUJITA, Masami OTSUKA, Synthesis and applications of biotinylated zinc binding SN1 [日本薬学会第 136 年会], 2016 年 3 月 26 日~2016 年 3 月 29 日,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Masahiro Kamo, Hiroshi Tateishi, Minami Yamamoto, Yoshinari Okamoto, Yuko Morikawa, Shogo MIsumi, Masami Otsuka, Mikako Fujita, 抗 HIV 剤 BMMP の作用機序解明及び活性改良 [第 63 回日本ウイルス学会学術集会], 2015 年 11 月 22 日~2015 年 11 月 24 日,福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Taha ALI, 岩丸佳奈, Halil CIFTCI, 古賀涼子, 黒崎博雅, 藤田美歌子, 岡本良成, 秀拓一郎, 牧野敬史, 倉津純一, 中尾光善, 梅澤一夫, Mohamed ABDEL-AZIZ, Gamal El-Din ABUO-RAHMA, Eman BESHAR, 大塚雅巳, Novel metal chelating molecules with anticancer activity [日本薬学会第 135 年会], 2015 年 3 月 26 日~2015 年 3 月 29 日,神戸学院大学・

兵庫医療大学（兵庫県・神戸市）

立石大, 安楽健作, 村尾直樹, 門出和精, 原田信志, 古賀涼子, 岡本良成, 藤田美歌子, 大塚雅巳, 新規 HIV 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体の創製 [日本薬学会第 135 年会], 2015 年 3 月 26 日~2015 年 3 月 29 日, 神戸学院大学・兵庫医療大学（兵庫県・神戸市）

加茂真宏, 立石大, 山本充奈美, 岡本良成, 森川裕子, 三隅将吾, 大塚雅巳, 藤田美歌子, 抗 HIV 剤 BMMP の作用機序解明と構造改変の試み [日本薬学会第 135 年会], 2015 年 3 月 26 日~2015 年 3 月 29 日, 神戸学院大学・兵庫医療大学（兵庫県・神戸市）

モハメドオスマン ラドワン, 古賀涼子, 岡本良成, 藤田美歌子, 大塚雅巳, A novel zinc chelating inhibitor of NF- κ B activation: Biotin modification and docking study [第 31 回日本薬学会九州支部大会], 2014 年 12 月 6 日~2014 年 12 月 7 日, 第一薬科大学（福岡県・福岡市）

加茂真宏, 立石大, 岡本良成, 森川裕子, 大塚雅巳, 藤田美歌子, Gag に作用する抗 HIV 剤 BMMP の作用機序解明と活性改良の試み [第 28 回日本エイズ学会学術集会] (2014 年 12 月 3 日~2014 年 12 月 5 日), 大阪国際会議場（大阪府・大阪市）

安楽健作, 立石大, 岡本良成, 藤田美歌子, 大塚雅巳, HIV-1 MA タンパク質とホスファチジルイノシトール 4,5-2 リン酸との結合部位を標的とした抗 HIV 薬の設計と合成 [第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム] (2014 年 11 月 26 日~2014 年 11 月 28 日), 神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

加茂真宏, 立石大, 岡本良成, 森川裕子, 大塚雅巳, 藤田美歌子, Gag に作用する抗 HIV 剤 BMMP の作用機序解明と活性改良の検討 [第 62 回日本ウイルス学会学術集会] (2014 年 11 月 10 日~2014 年 11 月 12 日), パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 良成 (OKAMOTO, Yoshinari)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：20194409

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大塚 雅巳 (OTSUKA, Masami)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：40126008

(4) 研究協力者

()