

受賞者

林 良雄

東京薬科大学薬学部・薬品化学教室

## 研究テーマ

微小管を標的とする新生血管内皮細胞障害性抗がん剤の開発研究

### 1. はじめに

微小管脱重合剤（チューブリン重合阻害剤）は、殺細胞作用に基づく抗がん剤としてがん化学療法に貢献しているが、我々は新戦略として本剤の有する腫瘍新生血管内皮細胞障害作用に注目して、新しい抗がん剤として血管障害剤（Vascular Disrupting Agent, VDA）の研究を行ってきた。本化合物は、固形がんの「アキレス腱」と言われる新生血管を機能不全にし、がんを兵糧攻めにする薬剤である。既に形成された新生血管を障害するために、進行がんにも有効と考えられており、殺細胞活性に基づく従来の微小管作用型抗がん剤と区別されている。

我々は1997年に発見したコルヒチン様微小管脱重合活性を有する麴かび由来の環状ジペプチドフェニラヒスチン（PLH, **1**）に注目し、有機合成を基本に構造活性相関研究を実施し、強力なVDA（NPI-2358, **2**, IC<sub>50</sub> = 15 nM, HT-29 cells）を創製した（図1）。<sup>1-6</sup> このNPI-2358は大学発の医薬品として米国で第一および第二相の臨床試験中である。本受賞の研究では、この環状ジペプチド化合物にさらに注目し、「分子認識に基づく創薬」として、抗がん剤の創薬研究を掘り下げ、新生血管内皮を強力に障害し、栄養・酸素の供給を絶つことで、がんを兵糧攻めにできる新しい抗がん化合物の開発を行ない、NPI-2358に続く大学発の医薬品開発研究を目指した。具体的には、1）NPI-2358の化学構造に基づいて、さらに優れた誘導体の合成・構造活性相関の展開（図2）、2）本抗がん化合物を用いたケミカルバイオロジー研究の展開である。後者は、微小管脱重合および新生血管内皮細胞障害の作用機構の解明をめざし、高活性な誘導体から光アフィニティープローブを作成し、主標的蛋白質である微小管蛋白質への結合様式を探索するもので、これを通じて微小管脱重合機構、さらに内皮細胞に対する選択的障害作用の機構を探索するものである。

NPI-2358誘導体として、強い殺細胞活性を有すると共に、光アフィニティー標識可能なKPU-244 (**4**) を創製できたことから、この化合物を基にビオチン化ケミカルプローブ KPU-244-B2 (**5**) を合成、これを用いた光アフィニティー標識研究

を実施したところ、本プローブはチューブリンを特異的に認識すると共に、コルヒチンやNPI-2358とチューブリン上で競合することを確認した。<sup>7</sup> 本報告書はこれらの研究の進捗を報告する。

### 2. 方法

#### 2-1) 化合物の合成

既にPLH (**1**) および強力な VDA であるNPI-2358 (**2**) の合成手法を確立していることから、<sup>3</sup> その合成手法に基づいてイミダゾール環上のアルキル鎖誘導体およびケミカルプローブの合成を行い、目的の化合物を得た。

#### 2-2) 化合物の評価

得られた化合物に関しては、HT-29ヒト大腸がん細胞に対する殺細胞活性およびチューブリンに対する結合活性を検討した。また、ケミカルプローブに関しては、チューブリンに対する活性を検討後に、チューブリンの光親和性標識を行った。

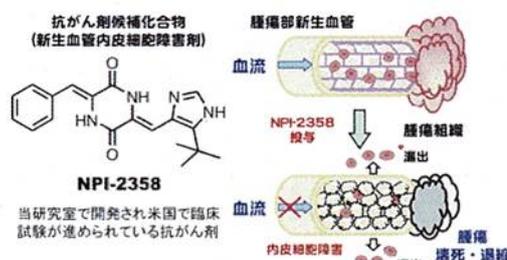


図1 新規抗がん剤候補化合物

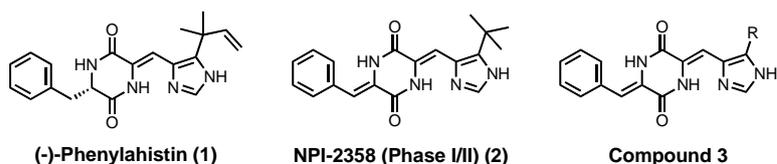


図2 フェニラヒスチンおよび強い抗がん活性を有する誘導体

### 3. 結果

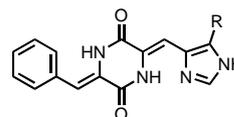
#### 3-1) フェニラヒスチンを戦略分子とする創薬研究： より強力な VDA の創製

NPI-2358 のフェニル基部分の様々な誘導から、チューブリンによりフェニル基部分は厳格に認識されており、その修飾が活性に大きく影響することが解っている。例えば、*m*- 及び *o*-位への比較的小さな置換基の導入は、活性の維持あるいは増強に繋がるが、*p*-位の修飾は極端な活性低下をもたらす。また、水酸基の導入は *o*-, *m*-, *p*-位全ての位置で、さらに *o*-位に窒素原子を有するピリジン環への変換でも、活性は低下する。今回、新たにイミダゾール環上の *tert*-butyl 基の誘導を実施した。

その結果、isopropyl 基までは活性が維持されるものの、分岐の無いアルキル鎖では活性が大きく低下した。このことから、NPI-2358 誘導体においてイミダゾール環上に存在する分岐アルキル鎖の存在がチューブリンの認識に重要な意味を持つことが明らかになった(表 1、未発表)。

また、チューブリンとコルヒチンが結合するとチューブリン内のトリプトファン残基に由来する自家蛍光の強度が減弱する事が知られている。我々はこの変化を利用して結合定数 ( $K_a$ ) を求める手法を確立し、誘導体の結合定数を測定した。そして殺細胞活性 ( $IC_{50}$ ) との相関を検討したところ、図 3 に示すごとく高い相関があることが示唆された。今後、得られた相関を基に、より有効な化合物の探索・創製を行いたいと考えている。

表 1. NPI-2358 誘導体 3 の殺細胞活性



compound	structure (R-)	$IC_{50}$ (nM) <sup>a</sup>
NPI-2358	<i>tert</i> -butyl-	15
KPU-108	methyl-	339
KPU-109	<i>n</i> -propyl-	153
KPU-111	isopropyl-	16
KPU-110	<i>n</i> -butyl-	112
KPU-112	<i>sec</i> -butyl-	31

<sup>a</sup> HT-29 cells

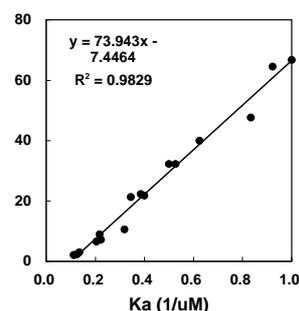


図 3  $IC_{50}$  と結合定数  $K_a$  の相関

#### 2. 光親和性プローブの合成と微小管脱重合機構解明への研究

NPI-2358 の高活性誘導体として、平面性の高い *o*-, *m*-位置換体に相当する  $\alpha$ -naphthyl および 5-isoquinoline 体への変換では、

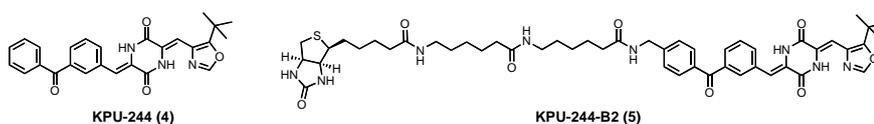


図 4 ケミカルプローブの開発

活性は維持され、化合物 4 の様な *m*-位ベンゾイル基置換体では活性の向上をもたらし、KPU-244 (図3,  $IC_{50} = 3.9$  nM) を見いだすことに成功した。この分子は光親和性標識可能なベンゾフェノン構造を有することから、本分子を用いたケミカルバイオロジーへの展開は、ジケトピペラジン型微小管作用薬の詳細な作用部位の特定、脱重合での分子機構解明へと繋がると考えた。標識部位検出のため、biotin-tag を導入したプローブ KPU-244-B2 を開発した(図 4)。<sup>7)</sup> プローブには十分な生物活性があることを検証後、チューブリンへの光親和性標識を実施した。

その結果、光照射により選択的にチューブリンを標識できることがわかった(図 5)。さらに、プローブは  $\beta$ -チューブリンを認識するコルヒチンと濃度依存的に競合することが示唆された。すなわ

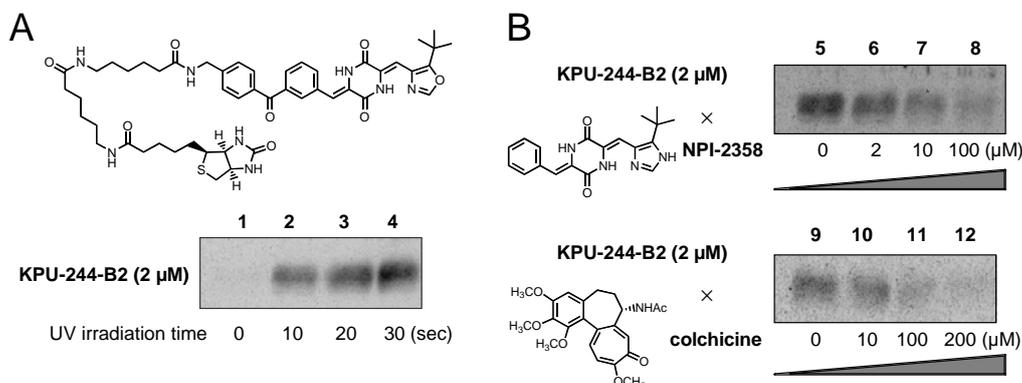


図 5 A) Tubulin への KPU-244-B2 光親和性標識、B) NPI-2358 およびコルヒチンとの競合試験 (30 秒照射)

ち、コルヒチン結合部位あるいはその周辺を認識し、脱重合を誘起すると考えられる。<sup>7)</sup>

#### 4. まとめ

病態代謝研究会のご助成により、強力な血管障害剤 (VDA)の開発研究においては、新たにNPI-2358のイミダゾール環上に存在する分岐アルキル鎖の重要性を見いだすことができた。一方、チューブリン上の結合部位の探索に当たっては、チューブリンを特異的に認識するプローブの作成に成功し、その光親和性標識が機能することを確認した。今後さらに詳細な結合部位の探索を進め、結合様式の解明を行なうと共に、ジケトピペラジン型微小管作用薬の詳細な微小管脱重合機構・新生血管内皮細胞障害作用機構の理解に迫りたいと考えている。御助成に深謝いたします。

#### 5. 発表論文、参考文献

- 1) Kanoh, K.; Kohno, S.; Asari, T.; Harada, T.; Katada, J.; Muramatsu, M.; Kawashima, H.; Sekiya, H.; Uno, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2847; b) Kanoh, K.; Kohno, S.; Katada, J.; Hayashi, Y.; Muramatsu, M.; Uno, I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 1130.
- 2) Kanoh, K.; Kohno, S.; Katada, J.; Takahashi, J.; Uno, I.; Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1451.
- 3) Hayashi, Y.; Sumie, O.; Tanaka, K.; Kanoh, K.; Kiso, Y. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8402.
- 4) Nicholson, B.; Lloyd, G. K.; Miller, B. R.; Palladino, M. A.; Kiso, Y.; Hayashi, Y.; Neuteboom, S. T. C. *Anti-Cancer Drugs* **2006**, 17, 25.
- 5) Hayashi, Y., Palladino, M. A., Grodberg, J. U.S. Pat. Appl. Publ. (2004), 44 pp; b) Hayashi, Y., Grodberg, J., Palladino, M. PCT Int. Appl. (2004), 148 pp. WO 2004054498.
- 6) Palladino, M. A., Lloyd, G. K., Hayashi, Y., Nicholson, B. U.S. Pat. Appl. Publ. (2005), 163 pp.
- 7) Yamazaki, Y.; Kohno, K.; Yasui, H.; Kiso, Y.; Akamatsu, M.; Nicholson, B.; Deyanat-Yazdi, G.; Neuteboom, S.; Potts, B.; Lloyd, G. K.; Hayashi, Y. *ChemBioChem*, **2008**, 9, 3074.