

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) フェロトーシス制御によるミトコンドリア病・癌治療薬開発  
(英語) The application of target ferroptosis for the treatment of  
mitochondrial disease and cancer

研究開発実施期間: 令和2年8月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 小坂 仁  
(英語) Hitoshi OSAKA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 学校法人自治医科大学 医学部 小児科学 教授  
(英語) Professor, Department of Pediatrics, Jichi Medical University

## II 研究開発の概要

### A アポモルフィン(Apo)の標的探索

Apo の X 位が methoxy 化された誘導体は不活性であることが示された。X 位の水酸基が薬効標的との結合に関わっていると推測し、Apo の X 位が methoxy 化された誘導体 D30 と、Y 位が methoxy 化された誘導体 D31 を FG エポキシビーズに固定化し、標的候補タンパク質との結合を Apo 原体のビーズと比較を試みた。D30 は FG ビーズに固定化できなかつたので、Apo ビーズと D31 ビーズの二者比較を行なつた。なお、D31 は、残つた Y 位の水酸基を介して FG ビーズに固定化されるはずなので、固定化後は不活性型と見做すことができる。Apo ビーズと D31 ビーズの精製により、バンドパターンの一部は異なるものの、よく似た精製結果が得られた。候補蛋白 1 と酵素 X について精製物の Western ブロットニングを行なつたところ、候補蛋白 1 については予想と反対の Apo<D31 という結果が得られた (図 1)。一方、酵素 X は Apo>D31 であつた。他の Apo の作用標的を探索するため、SILAC 法による比較プロテオーム解析を行なつた。すなわち、KCMC10 細胞を  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  (heavy) または  $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$  (light) を含む Lys, Arg 含有培地で培養した後、各細胞から whole cell lysate を調製し、Apo ビーズと D31 ビーズを用いてそれぞれ精製した後、両者を混合し、LC-MS/MS 解析に供した。その結果、1455 個のタンパク質が同定され、そのうち Apo/D31 比が 3 以上のものが 308 タンパク質、Apo/D31 比が 10 以上のものが 28 タンパク質見つかった。リスト上位の M ならびに N について Western ブロットニングを行なつたところ、SILAC の結果と一致して、Apo ビーズ選択的にこれらのタンパク質が精製されたことが確かめられた。従つて、リスト上位の多くは Apo 選択的な

結合因子であり、Apo 作用標的として有望と考えられる。さらに、これとは独立に、Apo の X 位と Y 位にアルキニル基を導入した誘導体 1 と 2 を新たに合成し、クリックケミストリーを用いてアジド基を有する FG ビーズに部位特異的に固定化した。X 位を介して固定化した誘導体 1 ビーズは活性型、Y 位を介して固定化した誘導体 2 ビーズは不活性型と考えられる。それぞれ固定化量を 3 点ふったビーズを用いて精製し、銀染色を行なったところ、両ビーズでよく似たバンドパターンの精製物が得られた。さらに Western ブロットニングを行なったところ、SILAC 解析では差が見られた M や N を含め、両ビーズへの結合にほとんど差は見られなかった。同定されたタンパク質の中で特に注目した候補蛋白 1 と酵素 X の Apo 結合ドメインの解析を行なった。候補蛋白 1 は 2549 アミノ酸のタンパク質キナーゼだが、昆虫細胞で発現させた精製組換えタンパク質が Apo ビーズに結合することを確認した後、欠損変異体を用いた解析を行なった。その結果、キナーゼドメインを含む C 末端側の 389 アミノ酸が Apo 結合に充分であることが判明した。しかしながら、並行して小坂研究室で行われた細胞レベルの解析の結果、候補蛋白 1 経路を抑えてもミトコンドリア病の改善効果が認められないことが判明したため、Apo 標的としての候補蛋白 1 の探索はペンディングすることとした。一方、酵素 X は大腸菌組換えタンパク質を用いた欠損変異体解析の結果、C 末端側の 188 アミノ酸が Apo 結合に充分であることが判明した。ところで、酵素 X の立体構造は解明されていないが、Alpha FoldII により確度の高い構造予測がなされている。この予測構造に基づいて Apo のドッキングシミュレーションを行なったところ、生化学的な解析結果と一致して、Apo が酵素 X の C 末端側に結合している構造モデルが得られ、Apo との結合に関わる可能性が高いアミノ酸残基が複数特定された。この知見に基づき、酵素 X の 6 つのアミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した点変異体を作製し、Apo 結合能を調べたが、Apo との結合が低下した点変異体は得られなかった。単一アミノ酸の変異では際立った効果が認められなかったため、複数の点変異を組み合わせる必要があるのかもしれない。

## B シグナルネットワークの解明

### フェロトーシス解析

フェロトーシス誘導薬 RSL3、FIN56、Artesnate 存在下では、ミトコンドリア病患者由来皮膚線維芽細胞 m.10158 T>C、p(S34P)、complex I では細胞死が誘導され Apo は代表的なフェロトーシス阻害薬である、Ferrostatin-1、liproxstatin-1 と同様の細胞死阻止作用があり、Deferoxamine より高い抗フェロトーシス活性を持つことが判明した。一方ネクロトーシス阻害薬ではフェロトーシス阻害効果は見られなかった Apo の作用点はフェロトーシス阻害にあることが明確になった。

次に不飽和脂肪酸の酸化状態として、C11-BODIPY581/591 試薬を用い、患者細胞においては酸化亢進があり、Apo により、酸化状態の阻害効果を観察した患者細胞では、負荷前でも酸化体が存在しフェロトーシス誘導薬により RSL3 によりその量は増えるが、フェロトーシス阻害薬である Ferrostatin-1 では酸化脂肪酸は減少し、Apo でも同様の結果を示した。

次に mRNA レベルでの解析を行った。フェロトーシスマーカーである PTGS2 (COX-2) の発現を評価した (Yang et al, 2014)。リアルタイム RT-PCR により RSL3 添加は、患者線維芽細胞における PTGS2 発現を上昇させ、この PTGS2 上昇は Apo 処理および Fer-1 処理によって阻害された。PTGS2 のウェスタンブロット分析では、Apo と Fer-1 処理により、患者線維芽細胞における PTGS2 タンパク質レベルが大幅に低下することが示された。

Apo の酵素 X への結合とその効果；酵素 X は NADH を NAD<sup>+</sup>に酸化し、同時に酸化型 CoQ10 を還元型 CoQ10 に還元する酸化還元酵素である。この酵素反応は消費される NADH をモニターすることにより可能である。そこで酵素 X を用いて、in vitro の酵素反応を行った。その結果 Apo は酵素 X の酵素活性血値を 2～3 倍程度上昇させ得ることが分かった。

NAD<sup>+</sup>/NADH 比測定； $2 \times 10^5$  の細胞を用い以下のプロトコールで調整したのち NADH、NAD<sup>+</sup>を測定した。測定は NAD<sup>+</sup>/NADH Quantification Colorimetric Kit (BioVision) を用いたその結果、Apo は 100nM のレベルで NAD<sup>+</sup>/NADH を上げることが明らかになった。一方フェロトーシス阻害薬であるフェロスタチン (Fer-1) には同様の活性を認めなかった

還元型コエンザイム Q10/酸化型コエンザイム Q10 の測定 ; LC-MS の系を確立したのち還元型および酸化型コエンザイム Q10 の測定を行った。患者ファイブロブラストへの Apo の添加により還元型コエンザイム Q10/酸化型コエンザイム Q10 比を上昇させることを見出した。一方では Fer-1 にはそのような作用は認めなかった。

### 誘導体合成

in vitro screening と活性基の同定と誘導体化 ; 東工大との共同研究により、既存の化合物ライブラリー (> 200 万) より、in vitro screening を行い Apo との構造類似性からの 24 種を同定した。また Apo の活性部位を同定する目的で、OH 基を CH<sub>3</sub>O に改変した誘導体合成をおこない活性保持に必須の官能基を同定した。合成可能な誘導体作成の検討を行い、16 種が合成可能であった。また、アポモルフィンの構造類似化合物 24 種と合成したアポモルフィン誘導体 16 種、合わせて 40 種の化合物についてアポモルフィンの持つ催吐作用を排除するため、ドパミン受容体結合活性を測定してアポモルフィンと同程度以上の結合活性を持つ化合物を排除するスクリーニングを実施した。

ドパミン受容体結合活性測定 ; 上記 40 化合物のドパミン活性を測定した (D2-R を安定発現する CHO 細胞を用い、ERK1/2 のリン酸化を指標に候補薬剤のドパミン D2 受容体への結合を測定した。Apo の D2 受容体への結合の EC<sub>50</sub> はおよそ 50nM であり、D3 (EC<sub>50</sub>;10.4nM) および D5 (EC<sub>50</sub>;206 nM) の 2 つの候補薬は、D2 受容体活性が高いため候補薬から除外した。

BSO を用いた細胞死アッセイ ; 上記 38 薬剤について、Leigh 脳症 m.10158T>C、p (S34P)、ND3 皮膚線維芽細胞を用い EC<sub>50</sub> を測定し候補薬を抽出した。その結果、10 薬剤が抗 BSO 細胞死活性が EC<sub>50</sub><300nM であった。

酵素 X の in vitro アッセイ ; アポモルフィン誘導体のうち上記 10 薬剤について、酵素 X の in vitro アッセイを実施した。ヒト組換え酵素 X、NADH (500 μM)、酸化型 CoQ<sub>10</sub> (200 μM) を含む反応混合液をマイクロプレートの各ウェルに分注し、所定量の試験化合物を各ウェルに添加して、所定の時間反応させた。ヒト組換え酵素 X タンパク質として、酵素 X-His タグ (Cayma 社、MW:42.5 kDa) を用いた。ヒト組換え酵素 X タンパク質は 50%グリセロールを含む緩衝液で溶解及び希釈して用いた、反応で消費される NADH の量を 340 nm の吸光度で測定することにより、反応の進行を定量的に測定した。吸光度の測定結果に基づき、1 分間に 1 μmol の生成物を生産するために必要な酵素量を 1 U の酵素 X 活性として算出した。化合物 D6 と及び D37 は、いずれもアポモルフィンと同程度の酵素 X 活性向上効果を示した。

フレックスアナライザーによる酸素消費量測定 ; 上記より見出した 2 種類の薬剤 (Apo-D6 および Apo-D37) を添加し、培養 24 時間後の酸素消費量 ; OCR を評価した。Apo-D6 に関しては、対照の DMSO (0.1%) と比べ、いずれの指標も有意な変化を示さなかった一方で、Apo-D37 では、対照の DMSO (0.1%) と比べ Basal OCR、ATP linked OCR、Maximal OCR、Spare Capacity の指標においても有意な改善を示した。この結果から、Apo-D37 が LS 患者由来の皮膚線維芽細胞に対してミトコンドリアの ATP 産生能を増加し得ることが示された。有望なシーク化合物を取得したので、これを基本骨格とした誘導体開発を進める。

### C Apo の抗がん作用解析

Apo から誘導体を新たに合成し、そのうちの 1 つが、Apo の有するドパミン作用を示さないこと、ヒト正常細胞を傷害せず、ヒト大腸癌細胞を選択的に抑制することを見出した。この、X5210 について、がん研 39 細胞パネルにより、どの癌腫の細胞をどの程度抑制するについて、既知の薬剤と相関を比較した。その結果、Y と r = 0.79、脂肪酸、コレステロール、Z と r = 0.74、という結果を得た。これは、Apo が脂質代謝経路に作用し癌細胞を選択的に抑制することを示唆しており、さらに薬効の分子メカニズム解明を進めた。まず、Apo および Apo 誘導体の中から、ヒト大腸癌細胞 SW480 を用いて癌細胞の抑制能を有する化合物の選定を行った。) 癌細胞を効果的に抑制する Apo 誘導体と Apo の候補化合物に関して、ヒト正常細胞、ヒト大腸癌細胞、ヒト膀胱癌細胞、ヒト口腔癌細胞に対する増殖、生存抑制能を、培養細胞系で評価した。その結果、Apo 及びその誘導体の中に、正常細胞を傷害せず、複数種の癌細胞を選択的に抑制する有望な候補化合物が複数得られた。さらに、その中で、D38 (X5459) が正常細胞を傷害せず、多種類の癌細胞を最も低濃度で抑制することを明らかにした。化合物の化学構造と癌細

胞に対する選択的抑制能の間にはある程度の構造活性相関が認められた。In vitro の検討で最も有望な候補化合物である D38 (X5386) およびその他の有望な候補化合物は、Dopamine 受容体に対する結合能を回避できていることを確認した。ここから、D38 は Dopamine 受容体結合による嘔吐等の副作用を回避しつつ、脳転移抑制を含む抗腫瘍効果を有する薬の有望な候補と考えられた。現在、in vivo での腫瘍抑制能、転移抑制能を評価するため、D38 の大量合成を行っている。また、Apo と Apo 誘導体の癌細胞の細胞死誘導がどのように行われるか電子顕微鏡による観察で検討した。その結果、液泡が多数出現すること、軽度のミトコンドリアマトリックスの膨張を認めることが明らかとなった。今後、癌細胞に対する細胞死誘導の分子機構の探索を行う予定である。

### **Elucidation of Signaling Network**

In the presence of the ferroptosis inducers RSL3, FIN56, and Artesnate, cell death was induced in mitochondria-derived skin fibroblasts m.10158 T>C, p(S34P), complex I. Apo is a typical inhibitor of ferroptosis, Ferrostatin-1, Apo has a cell death inhibition effect similar to that of ferrostatin-1 and liproxstatin-1, which are typical inhibitors of ferroptosis, and has higher anti-ferroptotic activity than deferoxamine. On the other hand, no inhibition of ferroptosis was observed with necrosis inhibitors, clearly indicating that the point of action of Apo is inhibition of ferroptosis.

Next, analysis at the mRNA level was performed. We evaluated the expression of PTGS2 (COX-2), a marker of ferroptosis (Yang et al., 2014). Real-time RT-PCR revealed that RSL3 addition increased PTGS2 expression in patient fibroblasts, and this PTGS2 increase was inhibited by Apo and Fer-1 treatments. Western blot analysis of PTGS2 showed that Apo and Fer-1 treatment significantly reduced PTGS2 protein levels in patient fibroblasts.

Binding of Apo to enzyme X and its effects; in vitro evaluation system enzyme X is an oxidoreductase that oxidizes NADH to NAD<sup>+</sup> and simultaneously reduces oxidized CoQ10 to reduced CoQ10. This enzymatic reaction can be monitored by monitoring the amount of NADH consumed. Therefore, we performed an in vitro enzymatic reaction using the enzyme X-. The results showed that Apo can increase the enzyme activity of enzyme X by 2- to 3-fold.

NADH/NAD<sup>+</sup> ratio assay; NADH and NAD<sup>+</sup> were measured in 2x10<sup>5</sup> cells after the following protocol. The results showed that Apo lowers NADH/NAD<sup>+</sup> at the level of 100 nM. On the other hand, ferrostatin (Fer-1), a ferroptosis inhibitor, did not show similar activity

Measurement of reduced coenzyme Q10/oxidized coenzyme Q10 ratio; after establishing the LC-MS system, oxidized and reduced coenzyme Q10 were measured. We found that the addition of Apo to patient fibroblasts increased the reduced coenzyme Q10/oxidized coenzyme Q10 ratio. On the other hand, no such effect was observed for Fer-1.

### **Derivative Synthesis**

In vitro screening, identification of active groups, and derivatization; We conducted in vitro screening of a library of existing compounds (>2 million) and identified 24 compounds with structural similarity to Apo. In order to identify the active site of Apo, we synthesized derivatives in which the OH group was modified to CH<sub>3</sub>O and identified the functional group that is essential for the retention of activity. The synthesizable derivatives were examined, and 16 derivatives could be synthesized. In order to eliminate the emetogenic effect of Apo, we conducted a screening of 40 compounds, including 24 compounds structurally similar to Apo and 16 synthesized derivatives of Apo, by measuring dopamine receptor binding activity to eliminate compounds with binding activity equal to or greater than that of Apo. Dopamine receptor binding activity was measured.

Dopamine receptor binding activity assay; Dopamine activity of the above 40 compounds was measured (CHO cells stably expressing D2-R were used to measure the binding of the candidate drugs to the dopamine D2 receptor using phosphorylation of ERK1/2 as an indicator. ;10.4 nM) and D5 (EC<sub>50</sub>;206 nM) were excluded from the candidate drugs due to their high D2 receptor activity.

Cell death assay using BSO; For the above 38 drugs, candidate drugs were extracted by measuring EC<sub>50</sub> using Leigh

encephalopathy m.10158T>C, p (S34P), ND3 skin fibroblasts. The results showed that 10 drugs had anti-BSO cell-killing activity with  $EC_{50} < 300$  nM. In vitro assay of enzyme X identified compounds D6 and D37 both showed similar levels of enzyme X activity enhancement as Apo.

Oxygen consumption was measured using a flex analyzer; the two drugs (Apo-D6 and Apo-D37) were added and the oxygen consumption rate (OCR) was evaluated after 24 hours of incubation. On the other hand, Apo-D37 showed significant improvement in Basal OCR, ATP linked OCR, Maximal OCR, and Spare Capacity compared to control DMSO (0.1%). These results indicate that Apo-D37 can increase the mitochondrial ATP-producing capacity of LS patient-derived skin fibroblasts. Now that we have obtained a promising seed compound, we will proceed with the development of derivatives using it as a basic skeleton.

### **Analysis of anti-cancer activity of Apo**

We synthesized new derivatives from Apo and found that one of them does not show the dopaminergic effect of Apo and selectively inhibits human colon cancer cells without damaging human normal cells. The X5210 was compared by the Cancer Institute 39-cell panel to correlate with known drugs to determine which carcinoma cells are inhibited and by how much. The results showed that Y and  $r = 0.79$ , fatty acids, cholesterol, and Z and  $r = 0.74$ . This suggests that Apo selectively suppresses cancer cells by acting on lipid metabolic pathway pathways, and further elucidated the molecular mechanism of drug efficacy. First, among Apo and Apo derivatives, we selected compounds with the ability to suppress cancer cells using human colon cancer cells SW480). For Apo derivatives and Apo candidate compounds that effectively inhibit cancer cells, we evaluated their ability to inhibit proliferation and survival against human normal cells, human colon cancer cells, human pancreatic cancer cells, and human oral cancer cells in a cultured cell system. As a result, we obtained several promising candidate compounds among Apo and their derivatives that selectively inhibit multiple types of cancer cells without damaging normal cells. Furthermore, among them, D38(X5459) was found to inhibit multiple types of cancer cells at the lowest concentration without injuring normal cells. A certain degree of structure-activity relationship was observed between the chemical structure of the compounds and their selective inhibitory ability against cancer cells, and in vitro studies confirmed that the most promising candidate compound, D38 (X5386), and other promising candidates were able to evade binding ability to the Dopamine receptor. From this, D38 was considered to be a promising candidate for a drug with anti-tumor effects, including inhibition of brain metastasis, while avoiding side effects such as emesis caused by Dopamine receptor binding. We are currently conducting mass synthesis of D38 to evaluate its tumor suppressive and metastasis inhibitory potential in vivo. We also examined how Apo and Apo derivatives induce cell death in cancer cells by electron microscopic observation. As a result, it was found that many vacuoles appeared and that a slight expansion of the mitochondrial matrix was observed. In the future, we plan to explore the molecular mechanism of cell death induction in cancer cells.

### **III 事後評価総合所見**

アポモルフィン (Apo) の有する細胞死阻害の機序がフェロトシス阻害によることを検証し、フェロトシス阻害の標的分子探索において酵素 X などの複数の蛋白を同定し、Apo の酵素 X 活性化による薬効と作用機序の検証を行った。その成果として、酵素 X 活性化剤について 2 種の特許出願を行った。

なお、各種がん細胞での薬効評価を行ったが、Apo の抗がん作用に関しては、詳細な分子機構を解明する必要がある。また、Apo 以外の新規化合物探索や疾患治療に対する有用性確認に更なる展開が必要である。酵素 X を標的にした新規スクリーニング系を構築し、新規化合物探索を行い、医薬品特許の強化について期待する。