

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)

平成 27 年度成果報告書 (公開)

プロジェクトリーダー (企業責任者)	エーザイ株式会社 シンサイエンティフィックアドバイザー 吉松 賢太郎
研究責任者	学校法人東京理科大学 理学部第一部応用化学科 教授 椎名 勇
参加機関	エーザイ株式会社、学校法人東京理科大学、学校法人北里研究所 公益財団法人がん研究会
研究開発課題	強力なゴルジ体機能阻害能を発現する新規分子標的抗がん剤の開発

### 1. 研究開発の目的

本研究のシーズである M-COPA は、small G protein の Arf-1 と GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) と 3 者複合体を形成しゴルジ体機能を阻害することで、*in vitro* ヒトがん細胞パネルにおいて既存抗がん剤との異なる抗がんスペクトラムを示し、*in vivo* ヒト乳がん BSY-1 細胞皮下移植モデルにおいて、腫瘍の完全退縮という明確な抗腫瘍効果を示す。本プログラムにおいて、化合物としては、M-COPA の課題である水溶性と代謝安定性を改善した誘導体を取得すること、また、薬理的には、ゴルジ体の機能阻害と抗がん活性の関連を検討し、M-COPA に高い感受性を示すがんのバイオマーカーを特定することにより、既存の抗がん剤に耐性を示すがん、あるいは、長期投与後に耐性を獲得したがんの中で、ゴルジ体機能阻害に高い感受性を示すがんに対して優れた効果を示す新規分子標的抗がん剤の創出を目指す。

### 2. 研究開発の概要

M-COPA の構造をもとに、*in vitro* ゴルジ散在化アッセイ・*in vitro* 抗がん活性、物性評価・代謝安定性評価、Arf1/GEF 複合タンパク質と候補化合物の複合体 (三者複合体) の X 線結晶構造解析・分子動力的シミュレーションによる溶液構造と候補化合物との相互作用情報、などにより、誘導体のデザインを行い、誘導体の合成を行う。M-COPA の不斉点は 7 箇所あり、全合成ステップは 14 段階もあることから、M-COPA の各置換基を最適化しつつ高い収率を維持して誘導体の供給を実現する。合成した誘導体は、ゴルジ阻害活性、抗がん活性、水溶性、代謝安定性の評価を行うとともに、キーとなる化合物については、ヒトがん細胞パネルアッセイ系 (JFCR39) を用いて、抗がんスペクトルの評価を行う。

X 線結晶構造解析・分子動力的シミュレーションにより得られた溶液構造に基づいて、*in silico* スクリーニングを実施し、M-COPA 母核と異なる化合物を検索し、また、M-COPA の構造をもとに、M-COPA とは異なる母核を有した新規化合物の合成を行い、新たなリード化合物候補を見出す。

ゴルジ機能阻害作用により高い感受性を示すがん、ならびに、M-COPA に対する感受性の異なるがんの解析を通じて、M-COPA の薬効に機能的に関与する因子を探索する。また、M-COPA によるゴルジ機能の阻害を *in vivo* で検出可能なバイオマーカーを探索し、臨床において PD (Pharmacodynamic) マーカーおよび POP (Proof of Pharmacology) に使用できるようにする。以上の検討を通じて、ゴルジ機能阻害剤に高い感受性を示すがんやバイオマーカーの特定を行う。

### 3. 研究開発の成果（平成 27 年度）

#### （1）M-COPA 誘導体の合成とその誘導体の活性、物性、代謝安定性評価【東京理科大学、がん研究会、エーザイ株式会社】

合成法の検討を進め、M-COPA 誘導体として 5 化合物の誘導体を合成した。その中で、2 化合物は、M-COPA に比べて、水溶性の向上に加え、代謝安定性の大幅な改善が見られた。その中で、1 化合物は抗がん活性が  $GI_{50}=2.04\ \mu\text{M}$  (M-COPA  $GI_{50}=0.013\ \mu\text{M}$ ) と不十分であったが、もう一つの化合物は  $GI_{50}=0.407\ \mu\text{M}$  と当面の目標の  $GI_{50}=0.1\ \mu\text{M}$  に近い活性を示した。

#### （2）M-COPA とは母核の異なる化合物の合成【エーザイ株式会社】

テトラヒドロナフタレン骨格の化合物を 6 化合物合成したが活性を得ることができなかった。

#### （3）Arf1/GEF 複合タンパク質と候補化合物の複合体（三者複合体）の立体構造解析【エーザイ株式会社】

高純度の Arf1/GEF/M-COPA 三者複合体試料の結晶を作製し、X 線回折データを放射光施設 (KEK PF-BL5) で取得し、分子置換法で位相決定を行った。構造精密化を行い、 $1.8\text{\AA}$  分解能の三者複合体結晶構造を得た ( $R=0.176$ ,  $R_{\text{free}}=0.219$ )。また、複数の M-COPA 誘導体を用いた構造決定を行い、構造を基にしたドラッグデザインについて検討を進めた。

#### （4）Arf1/GEF 複合タンパク質と候補化合物の複合体（三者複合体）の溶液構造解析およびそれに基づいた *in silico* スクリーニング【北里大学】

（3）で得られた X 線結晶構造を初期構造とした分子動力的シミュレーションを行い、良好な溶液構造モデルと相互作用情報を得て、M-COPA と標的蛋白との相互作用に有利な置換基部位と水溶性を高めるための置換基導入部位の提案を行った。また、分子動力的シミュレーションから得られた 4 タイプの結合部位構造に対して、アンサンブルドッキング法を用いて *in silico* スクリーニングを行い、M-COPA とは異なる骨格構造の化合物で、 $GI_{50}$  値として  $3\ \mu\text{M}$  程度の抗がん活性を有する化合物を得た。

#### （5）誘導体のゴルジ阻害活性・ヒトがん細胞パネルでの評価【がん研究会】

合成された化合物や *in silico* スクリーニングで得られた化合物について、ゴルジ体機能を阻害していることの確認の評価、ならびに、ヒトがん細胞パネルを用いて、抗がんスペクトラムが M-COPA と類似していることを確認した。

#### （6）ゴルジ機能阻害を *in vivo* で検出可能なバイオマーカーの検討【がん研究会】

M-COPA によるゴルジ機能阻害の *in vivo* Proof of Pharmacology として、昨年度までに、Agalacto 型 N 型糖鎖に反応するレクチンの *Griffonia simplicifolia* Lectin II (GSL II) を用いて M-COPA 処理後に GSLII 反応性糖鎖が誘導されることを明らかにしている。本年度は、M-COPA により誘導された GSLII 反応性の糖鎖構造として、複数の Agalacto 型 N 型糖鎖構造を MALDI-MS 法により同定した。これらの糖鎖を検出することで M-COPA のゴルジ体阻害をモニターすることができる結論した。

#### （7）受容体チロシンキナーゼの増殖シグナルに依存しているがん細胞に対する効果【がん研究会】

受容体チロシンキナーゼ MET 遺伝子が増幅した胃がん細胞においては、MET の細胞表面発現

は高く、M-COPA 処理によりその発現が顕著に低減した。また、これら MET 遺伝子増幅胃癌細胞は増殖が MET のシグナルに依存しており、M-COPA により、他の胃癌細胞に比べて効果的に細胞増殖が抑制された。ウェスタンブロット法により、M-COPA が MET のプロセッシングを抑制し、下流シグナルの活性化を抑制することを明らかにした。また、*in vivo* 皮下移植モデルにおいて、M-COPA は MKN45 細胞移植腫瘍に有意な抗がん効果を示すこと、M-COPA 投与により、活性化型のリン酸化 MET の細胞膜上での発現が顕著に低減することを確認した。以上のことから、M-COPA は MET のプロセッシングを抑制し、細胞膜上での発現を抑制することにより MET の活性化を阻害すること、その結果、MET 依存胃癌細胞に抗がん効果を発揮することを *in vitro* および *in vivo* で明らかにした<sup>1)</sup>。

MET 胃癌に加え、FGFR2 増幅胃癌である KATO III 細胞や EGFR 変異肺癌である NCI-H3255、PC-9 細胞でも、M-COPA により RTK の表面発現、下流のシグナル伝達が抑制され、細胞増殖が抑制された。NCI-H3255 については、*in vivo* 皮下移植モデルでも抗がん効果を確認した。以上のように、M-COPA は、受容体チロシンキナーゼの増殖シグナルに依存している種々のがん細胞に対して抗がん効果を示すことを明らかにした。

- 1) M-COPA, a Golgi disruptor, inhibits cell surface expression of MET protein and exhibits antitumor activity against MET-addicted gastric cancers, Ohashi Y., Okamura M., Hirosawa A., Tamaki N., Akatsuka A., Wu K.-M., Choi H.-W., Yoshimatsu K., Shiina I., Yamori T., Dan S., *Cancer Res.* 2016 Jul 1; 76(13): 3895-3903. Doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2220. Epub 2016 Apr 12.