

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) ケミカルバイオロジーを基盤としたがん代謝制御薬剤の開発  
(英語) Development of anticancer agents targeting cancer metabolism by chemical biology-based approaches
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター  
ケミカルバイオロジー研究グループ 副センター長 長田 裕之
- 所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Sustainable Resource Science,  
Chemical Biology Research Group, Deputy Director, Hiroyuki Osada
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) がん代謝制御化合物の最適化  
開発課題名： (英語) Structural optimization of cancer metabolism-regulating compounds
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター  
ケミカルバイオロジー研究グループ 副センター長 長田 裕之
- 所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Sustainable Resource Science,  
Chemical Biology Research Group, Deputy Director, Hiroyuki Osada
- 分担研究 (日本語) がん代謝制御化合物の作用解析  
開発課題名： (英語) Mechanism of action analysis of cancer metabolism-regulating compounds
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター  
ケミカルバイオロジー研究グループ 専任研究員 川谷 誠
- 所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Sustainable Resource Science,  
Chemical Biology Research Group, Senior Research Scientist,  
Makoto Kawatani

分担研究 (日本語) ケモプロテオミクス解析を用いた代謝作用薬の評価  
開発課題名: (英語) Evaluation of cancer metabolism-regulating compounds by chemoproteomics

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター  
ケミカルバイオロジー研究グループ 専任研究員 室井 誠  
所属 役職 氏名: (英語) RIKEN Center for Sustainable Resource Science,  
Chemical Biology Research Group, Senior Research Scientist,  
Makoto Muroi

分担研究 (日本語) がん代謝制御化合物の in vivo 抗がん活性評価  
開発課題名: (英語) Evaluation of in vivo antitumor activity of cancer metabolism-regulating compounds

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所  
第1生物活性研究部 部長 川田 学  
所属 役職 氏名: (英語) Microbial Chemistry Research Foundation, Institute of Microbial  
Chemistry, Laboratory of Oncology, Laboratory Head, Manabu Kawada

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

がんの代謝機構は、腫瘍ごとに異なる代謝多様性や過酷な環境下でも生存・増殖を可能にする代謝適応性を有し、近年、その本態はがん遺伝子やがん抑制遺伝子の産物(タンパク質)による代謝リプログラミングであることが明らかになってきた。したがって、がん代謝の多様性や適応性をプロテオームの観点から理解し、制御することが新規抗がん剤の創出につながることを期待される。本研究では、我々がこれまで開発してきた薬剤プロテオミクス(ChemProteoBase)を基盤にして、がん代謝を標的とした新規抗がん剤リードを開発することを目的とする。我々はすでに、独自の化合物資源や薬剤探索法を活用してがん代謝に作用する候補化合物(化合物Aおよび化合物B)を取得しており、これらをシード化合物として、作用機構解析・構造最適化・動物実験を通して、新規抗がん剤リードを開発する。

化合物Aの細胞内標的分子を明らかにする目的で、ChemProteoBase解析を実施した。化合物Aを処理した細胞のプロテオーム変動プロファイルとデータベースに登録されている作用既知薬剤(およそ200化合物)のプロテオーム変動プロファイルとの比較解析を通じて、化合物Aはタンパク質Xをターゲットにしていることが示唆され、実際化合物Aはin vitroでタンパク質Xの活性を阻害することが明らかになった。

化合物BはChemProteoBase解析で高い類似度を示す薬剤がなかったため、標的分子を予測することはできなかった。そこで次に、薬剤メタボローム解析を実施した。その結果、化合物Bを処理した細胞ではタンパク質Yの基質が顕著に蓄積していたことから、化合物Bはタンパク質Yをターゲットにしている可能性が考えられた。実際、化合物Bはin vitroでタンパク質Yの活性を阻害することが明らかになった。

化合物 A および化合物 B の大量合成と誘導体展開を目的に、化合物 A および化合物 B の化学合成を行った。化合物 A は、市販のアミン体を出発原料に 2 工程でジアステレオマーの混合物として得た後、分取薄層クロマトグラフィーで分離する合成ルートを確認した。化合物 B は、市販のメチルクマリン体を出発原料に 3 工程からなる合成ルートを確認した。確認した合成ルートをもとに、化合物 A および化合物 B を動物実験用に大量合成した。また、化合物 A と化合物 B の誘導体をそれぞれ十数種合成した。

化合物 A および化合物 B の安全性および最大耐用量を調べる目的で、マウス急性毒性試験を実施した。4 週齢雌 ICR マウスにさまざまな濃度の化合物 A あるいは化合物 B を経口投与、静脈内投与あるいは皮下投与し、2 週間にわたり体重や体調、各種臓器重量などを経時的に観察した。化合物 A は、検討した最大濃度 50 mg/kg 静脈内投与で死亡が確認され、それ以外の条件では特に異常はみられなかった。化合物 B は、検討したすべての条件で特に異常はみられなかった。また、これらの結果をもとに、マウスゼノグラフトモデルを用いた化合物 A および化合物 B の抗がん活性試験に着手した。

Tumor cells have metabolic variability and flexibility to sustain growth and survival. Such a metabolic rewiring is mainly regulated by oncogene and tumor suppressor gene products. Therefore, understanding and regulating tumor metabolism from the point of view of proteome would be a promising strategy for the development of novel anticancer drugs. The purpose of this study is to develop novel anticancer agents targeting tumor metabolism based on our chemical biology research platforms including chemoproteomics. We have already found several compounds affecting tumor metabolism (compound A and compound B) by our cell-based screens. We use those compounds as drug seeds to develop novel anticancer drug leads through their mode of action studies, structural optimization analyses, and animal experiments.

We performed ChemProteoBase analysis to elucidate the intercellular molecular target of compound A. ChemProteoBase compares the proteomic changes by compound A with those by well-characterized reference compounds contained in the database. According to the result of ChemProteoBase profiling, we found that compound A targets protein X.

ChemProteoBase profiling could not predict the target of compound B. Next, we performed metabolome analysis of compound B-treated cells, and found that the substrate of protein Y was markedly accumulated in compound B-treated cells. Indeed, compound B inhibited the activity of protein Y *in vitro*.

We performed chemical synthesis of compound A and compound B for the purpose of the large-scale synthesis and the structure-activity relationship (SAR) study. Using the commercially available amine derivative as the starting material, compound A was synthesized through 2 steps. Using the commercially available methyl-coumarin derivative as the starting material, compound B was synthesized through 3 steps. We performed the large-scale synthesis of compound A and compound B using those established synthesis routes. We also synthesized several derivatives of compound A and compound B, respectively.

To examine the safety and the maximum tolerated dose of compound A and compound B, we carried out acute toxicity tests. Four-week-old female ICR mice were administered various doses

of compound A or compound B orally, intravenously, or subcutaneously, and then the body weight and the physical condition were observed for 2 weeks. Compound A showed no toxicity except for the maximum dose of 50 mg/kg intravenous administration. Compound B showed no toxicity under any test conditions. Based on these results, we started *in vivo* antitumor tests of compound A and compound B using mouse xenograft models.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 6 件)

1. Lim CL, Nogawa T, Okano A, Futamura Y, Kawatani M, Takahashi S, Ibrahim D, Osada H. Unantimycin A, a new neoantimycin analog isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.* 2016, 69, 456-8.
2. Kawamura T, Kawatani M, Muroi M, Kondoh Y, Futamura Y, Aono H, Tanaka M, Honda K, Osada H. Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival. *Sci. Rep.* 2016, 6, 26521.
3. Subedi A, Futamura Y, Nishi M, Ryo A, Watanabe N, Osada H. High-throughput screening identifies artesunate as selective inhibitor of cancer stemness: Involvement of mitochondrial metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016 477, 737-42.
4. Kondoh Y, Honda K, Hiranuma S, Hayashi T, Shimizu T, Watanabe N, Osada H. Comparative chemical array screening for p38 $\gamma$ / $\delta$  MAPK inhibitors using a single gatekeeper residue difference between p38 $\alpha$ / $\beta$  and p38 $\gamma$ / $\delta$ . *Sci. Rep.* 2016, 6, 29881.
5. Kumar A, Kawamura T, Kawatani M, Osada H, Zhang KY. Identification and structure-activity relationship of purine derivatives as novel MTH1 inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* 2016, in press.
6. Kawatani M, Muroi M, Wada A, Inoue G, Futamura Y, Aono H, Shimizu K, Shimizu T, Igarashi Y, Takahashi-Ando N, Osada H. Proteomic profiling reveals that collismycin A is an iron chelator. *Sci. Rep.* 2016, 6, 38385.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 酸化ヌクレオチド加水分解酵素 MTH1 阻害剤の作用解析, ポスター, 川谷誠, 河村達郎, 室井誠, 青野晴美, 二村友史, 田中美帆, 長田裕之, 第 20 回日本癌分子標的治療学会学術集会, 2016/5/31, 国内.
2. エネルギー代謝プロファイリングを用いたがん代謝阻害薬の探索研究, ポスター, 二村友史, 川谷誠, 青野晴美, 室井誠, 田中美帆, 長田裕之, 第 20 回日本癌分子標的治療学会学術集会, 2016/5/31, 国内.
3. 化合物アレイ法による医薬シードの探索, 口頭, 長田裕之, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内.

4. 分子標的治療薬開発の落とし穴, 口頭, 長田裕之, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
5. Characterization of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival, ポスター, 河村達郎, 川谷誠, 室井誠, 青野晴美, 二村友史, 長田裕之, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
6. Development and utilization of bioenergetic profiling system for drug discovery, ポスター, 二村友史, 青野晴美, 川谷誠, 室井誠, 長田裕之, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
7. Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival, ポスター, 河村達郎, 川谷誠, 室井誠, 近藤恭光, 二村友史, 青野晴美, 田中美帆, 本田香織, 長田裕之, 28th EORTC-NCI-AACR symposium on molecular targets and cancer therapeutics, 2016/11/30, 国外.
8. Analysis of MTH1 inhibitors by ChemProteoBase, the drug-target analysis system based on proteomic profiling, ポスター, 室井誠, 川谷誠, 河村達郎, 二村友史, 長田裕之, The 21st JFCR-International Symposium on Cancer Chemotherapy, 2016/12/14, 国内.
9. ChemProteoBase を用いた MTH1 阻害剤の作用解析, 口頭, 室井誠, 川谷誠, 河村達郎, 近藤恭光, 二村友史, 田中美帆, 青野晴美, 本田香織, 長田裕之, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/3/18, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし