

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) 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
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
ACceleration Transformative research for Medical innovation

研究開発課題名：(日本語) 癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする低分子薬剤の前臨床開発試験
(英語) Preclinical Development of small molecule drug candidate which mimics the function of tumor suppressor 4E-BP1

研究開発代表者 (日本語) 株式会社 PRISM BioLab 特別顧問 小路 弘行
所属 役職 氏名：(英語) PRISM BioLab Co., Ltd, Founder & Chief Scientific Adviser,
Hiroyuki Kouji

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 1 (日本語) 癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする低分子化合物のデザイン・合成
開発課題名：(英語) Design and synthesis of small molecules which mimics the function of tumor suppressor 4E-BP1

研究開発分担者 (日本語) 株式会社 PRISM BioLab 研究開発部 主幹研究員 今村 佳正
所属 役職 氏名：(英語) Research and development department, PRISM BioLab Co., Ltd,
Senior Scientist, Yoshimasa Imamura

分担研究 2 (日本語) MO 化合物の細胞評価：作用機構の解析
開発課題名：(英語) Evaluation of the effect of MO compounds in cells; and mechanism underlying suppression of tumor growth.

研究開発分担者 (日本語) 愛知県がんセンター研究所 感染腫瘍学部 部長 小根山 千歳
所属 役職 氏名：(英語) Division of Microbiology and Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute, Chief, Chitose Oneyama

分担研究 3 (日本語) MO 化合物の標的蛋白との結合解析・作用機構解析

開発課題名： (英 語) Analysis of the interaction of MO compounds with their target protein
研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院薬学研究科 准教授 吉田 卓也
所属 役職 氏名： (英 語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka university,
Associate Professor, Takuya Yoshida

分担研究 4 (日本語) MO 化合物の抗癌活性評価

開発課題名： (英 語) Anti-tumor activity evaluation of MO compounds

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所
特別研究員 中野 洋文

所属 役職 氏名： (英 語) Laboratory for Chemistry and Life Science,
Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology
Staff Scientist Hirofumi Nakano

分担研究 (日本語) MO 化合物の X 線結晶構造解析と標的蛋白への結合解析

開発課題名： (英 語) X-ray crystal analysis of MO compounds and its binding site in eIF4E

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所
教授 中村 浩之

所属 役職 氏名： (英 語) Laboratory for Chemistry and Life Science,
Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology
Professor Hiroyuki Nakamura

分担研究 5 (日本語) MO 化合物の in vivo 抗がん活性のマウスを用いた評価

開発課題名： (英 語) Evaluation of anti-oncogenic activities of MO components for in vivo
tumorigenesis in mouse

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人滋賀医科大学 微生物感染症学部門 准教授 井上 寛一

所属 役職 氏名： (英 語) Division of Microbiology and Infectious Diseases, Shiga University
of Medical Science, Associate Professor, Hiromasa Inoue,

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者 (課題リーダー)： 株式会社 PRISM BioLab 小路 弘行

<成果概要：和文>

今年度は、リード化合物 M030003 の SAR 取得を目的に周辺誘導体合成および評価を行い、M030003 と同等以上の活性を有する複数の化合物を見出すことに成功した。

代表化合物について、単結晶の取得、X 線結晶構造解析を行い絶対立体配置を決定することに成功した。

得られた化合物について、NMR を用いた MO 化合物と標的蛋白質との相互作用解析を実施した。その結果、化合物と標的蛋白質である eIF4E との相互作用を NMR のケミカルシフト値の変化により

検出することができた。また、MO 化合物が 4E-BP1 ミミックとして標的蛋白質 eIF4E に作用していることを検証するため、プロテアーゼ感受性に化合物が及ぼす影響についても調べた。実験系を最適化することで、MO 化合物が eIF4E のプロテアーゼ分解を誘導する条件を見出し、MO 化合物が細胞内で eIF4E と相互作用していることが示唆された。さらに、MO 化合物の結合部位を特定するために、光親和性化合物を用いた LC/MS/MS 解析や MO 化合物と標的蛋白質との複合体構造解析を目指して結晶化条件の検索についてもあわせて実施した。

一方、スクリーニングによって選ばれた化合物について、同所性膵臓腫瘍を形成するヌードマウス実験系を用いて腫瘍抑制作用の評価を行った。評価に際し、化合物の大量供給のための合成法・精製法の検討を行い、収率および純度の向上を図り、供給可能な合成法の確立を行った。数化合物の動物モデルでの評価の結果、2 化合物について腫瘍抑制活性が認められた。今後適正投与量や投与条件等について検討していく予定である。

<成果概要：英文>

M030003 is a lead compound which mimics the function of tumor suppressor 4E-BP1. To develop more effective compounds, we synthesized M030003 derivatives and evaluated the cytostatic activity of these compounds by soft agar colony formation and 3D sphere culture method. As a result, we found several compounds suppressed growth of cancer cells as well or better than M030003. In contrast, these compounds had no cytotoxic effects in normal cells.

We obtained the single crystals of representative compounds and we determined the absolute configuration of these compounds by X-ray crystal structure analysis.

We analyzed the inter-molecular interactions between selected MO compounds and their target protein eIF4E by using NMR spectroscopy. We found the interaction of them by observation of chemical shift perturbations in eIF4E. In order to confirm the mechanism of action of MO compounds as a 4E-BP1 mimetics in cells, we investigate the effect of compounds on protease susceptibility. At first we optimized the experimental conditions of the eIF4E binding assay. The result suggested that the MO compound interacts with eIF4E in cells.

Furthermore, we synthesized the photo affinity labeled compounds to identify the binding site of MO compounds by LC/MS/MS analysis and crystallization screening of eIF4E was performed toward the determination of the complex structure.

We improved the synthetic route and purification method to provide large amounts of samples for in vivo model and assessed the anti-oncogenic effect of several MO compounds on pancreatic tumor formation of nude mouse which orthotopically injected with human pancreatic cancer cell line. As a result of this study, we found that two compounds showed anti-oncogenic activity in this orthotopic pancreatic cancer model.

分担研究 1

癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする低分子化合物のデザイン・合成【(株) PRISM BioLab】

昨年度見出されたリード化合物 M030003 の周辺 SAR 取得を目的に、本年度は M030003 周辺誘導体合成

を行った。その結果、M030003 と同等以上の活性を有する化合物の創出に成功した。また、in vivo 評価用化合物の大量供給のため、合成法の検討を行い収率の向上を達成した。

Design and synthesis of small molecules which mimics the function of tumor suppressor 4E-BP1 (PRISM BioLab Co., Ltd.)

M030003 is a lead compound which mimics the function of tumor suppressor 4E-BP1. We synthesized derivatives to develop the more effective compound than M030003. Furthermore we developed the synthetic route and purification method to provide large amounts of samples for in vivo model study.

As a result, we found several compounds which have anti-oncogenic activity as well as M030003 and achieved improvement the method to provide for in vivo samples.

分担研究 2

M0 化合物の細胞評価：作用機構の解析 【愛知県がんセンター】

昨年度に標準化と至適化を行った化合物評価系を用いて、今年度はバックアップの M0 新規化合物について、M030003 同様に癌細胞及び正常細胞での評価を行った。その結果、M030003 同等以上の活性を有する数種類の M0 化合物を見出した。さらに今年度は、M0 化合物が 4E-BP1 ミミックとして作用しているかを検証するための実験系を至適化した。

Evaluation of the effect of MO compounds in cells; and mechanism underlying suppression of tumor growth. 【Aichi Cancer Center Research Institute】

To develop the more effective compounds related to M030003, we evaluated the effects of M030003-related compounds in pancreatic cancer cells (PANC-1) and normal cells (MEFs and HaCaT). Under the conditions previously optimized, we assayed MO compounds and found that several compounds suppressed growth of PANC-1 cells as well or better than M030003. In contrast, these MO compounds had no cytotoxic effects in normal cells. Further, to confirm the mechanism of action of MO compounds as a 4E-BP1 mimic in cells, we optimized the experimental conditions of the eIF4E binding assay.

分担研究 3

M0 化合物の標的蛋白との結合解析・作用機構解析 【大阪大学大学院】

昨年度までの検討で選定した構造解析用 M0 化合物の評価を NMR にて実施し、標的蛋白質との相互作用を検出した。また BP1 ペプチドを用いて M0 化合物の 4E-BP1 ミミックとしての機能解析をおこなった。さらに、M0 化合物と標的蛋白質 eIF4E との複合体構造解析を目指して結晶化条件の検索を進めた。

Analysis of the interaction of MO compounds with their target protein 【Osaka University】

We analyzed the inter-molecular interactions between selected MO compounds for structural analysis and their target protein eIF4E by using NMR spectroscopy. Under the conditions previously optimized, chemical shift perturbations in eIF4E were observed. In order to evaluate the mode of action of MO compounds as a 4E-BP1 mimic, the interactions of 4E-BP1-derived peptide and MO compounds were also analyzed. Furthermore, crystallization screening of eIF4E was performed toward the determination of the complex structure.

分担研究 4

3 次元スフェア培養法による抗癌活性評価 と MO 化合物の X 線結晶構造解析と標的蛋白への結合解析 【東京工業大学】

3 次元スフェア培養法による抗癌活性評価

- ・ MO30003 は 4E-BP1 欠損している PANC-1、4E-BP1 がリン酸化され失活している MIAPaCa-2 などヒト膵臓癌細胞や 4E-BP1 がリン酸化され失活している大腸癌細胞 HCT116 などヒトの難治性癌由来の細胞（いずれも KRAS 活性化変異癌細胞）の 3 次元スフェア増殖を抑制した。
- ・ 新たにデザイン・合成された MO30003 周辺化合物の抗癌活性を上記の癌細胞で評価し、MO30003 を上回る活性が期待できる新規 MO 化合物を見出した。

MO 化合物の X 線結晶構造解析と標的蛋白への結合解析（平成 28 年度追加テーマ）

- ・ 結晶が得られた新規 MO 化合物の立体構造を解析し、高活性新規 MO 化合物のデザインに活用した。
- ・ 平成 28 年度の追加予算で購入した分取 HPLC 装置を用いて、MO 化合物ならびに MO 化合物を結合させた蛋白質を精製し、質量分析計により結合アミノ酸残基を同定する実験条件を確立した。

Anti-tumor activity of MO compounds with 3D sphere culture method & Analysis of 3D structure of MO compounds and its binding site in eIF4E 【Tokyo Institute of Technology】

Anti-tumor activity of MO compounds with 3D sphere culture method

- ・ MO30003 inhibited proliferation with 3D sphere culture method of human cancer cells with KRAS activated mutation; pancreatic cancer cell PANC-1 which is 4E-BP1 deficient and also pancreatic cancer cell MIAPaCa-2 and cancer cell colon cancer cell HCT116 in which 4E-BP1 is inactive by phosphorylation.
- ・ New MO compounds were evaluated their anti-tumor activity as above. Several compounds have shown superior activity than MO30003 were selected for further evaluation.

Analysis of 3D structure of MO compounds and its binding site in eIF4E

- ・ Structure of MO compounds were revealed by X-ray crystal analysis and has been applied to design new MO compounds.
- ・ HPLC/MS analysis has started to find amino acids in the eIF4E fragment that bind to new MO compounds containing photo-crosslinking moiety.

分担研究 5

MO 化合物の in vivo 抗がん活性のマウスを用いた評価 【滋賀医科大学】

今年度は、細胞レベルでのスクリーニングによって選抜された MO 化合物について、主として同所性膵臓腫瘍を形成するヌードマウス実験系を用いて in vivo 抗がん活性およびその副作用などを検討した。達成度は 80 %である。複数の MO 化合物についてヒト膵臓癌細胞株 MIAPaCa-2 を用いてヌードマウスへの膵臓接種（同所性）の実験系で腫瘍抑制活性の評価を行った。このうち 2 化合物について腫瘍抑制活性が認められた。現在、副作用なども検討しつつ、適正投与量や投与条件などを検討中である。これらの化合物について、直腸癌を高率で発生する遺伝子改変マウス実験系や活性型 KRAS 遺伝子癌化マウス細胞株による腫瘍形成系の実験は今年度は間に合わず次年度に持ち越したが、今後検討してゆく予定である。

Evaluation of anti-oncogenic activities of MO components for in vivo tumorigenesis in mouse

【Shiga University of Medical Science】

We investigated in vivo anti-oncogenic activity and side effects of MO compounds selected by in vitro anti-oncogenic activity assay for human cancer cell lines by using mouse orthotopic pancreatic cancer model system. The degree of achievement for this purpose was about 80% in this year. We assessed the anti-oncogenic effect of several MO compounds on pancreatic tumor formation of nude mouse orthotopically injected with human pancreatic cancer cell line, MIAPaCa-2. Among these compounds, two compounds showed anti-oncogenic activity. At present, analyses of optimal concentration of the MO compounds and their side effect are in progress. As to these MO compounds, we are going to perform in vivo anti-oncogenic assays using the transgenic mice which generate rectal tumors at high frequency and activated-KRAS-transformed mouse cell lines in next year.

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 0 件）

本課題に関する発表はありません。

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

本課題に関する発表はありません。

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

本課題に関する発表はありません。

- (4) 特許出願

該当なし