

対象研究テーマ:HGF-Met系を中心とするがん転移・薬剤耐性のメカニズムと制がん・創薬研究

研究期間:2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目:HGF-Metの活性化機構に基づく分子創薬研究—X線構造を基盤とした最適化研究

研究代表者:大阪府立大学大学院理学系研究科 准教授 木下誉富

研究成果の概要:

HGFβ・ベンゼン誘導体複合体のX線構造に基づき、辺縁に正電荷及び負電荷を有するサブポケット(S2)を狙ったStructure-Based Drug Design (SBDD)を行ったが、活性向上には至らなかった。このことはS2サブポケットを埋めるだけでは活性向上が難しいことを示唆している。そこで、HGFβ-Metの相互作用に関わる他のサブポケット(S1, S1')を同時に阻害するペプチド性化合物を分子モデリングにより設計した。これらの化合物は弱いながら阻害活性を示した。今後、エントロピーロスを最小限にするためにコンホメーションを分子内で固定化した化合物を設計して高活性HGFアンタゴニストの創出を目指す。

研究分野:構造生物学、創薬化学

キーワード:HGF、X線結晶構造解析、Structure-based drug design (SBDD)

### 1. 研究開始当初の背景

HGF(肝細胞増殖因子)はMet受容体を介して多彩な生理機能を発揮する。HGFは肝臓をはじめ、腎臓、心血管系、脳神経系など複数の組織において再生や保護を担う生理活性タンパク質であり、HGFを投与・補充することが、肝硬変、腎不全、脊髄損傷、筋萎縮性側索硬化症、皮膚潰瘍など様々な疾患の治療・改善につながる事が明らかにされている。一方、悪性腫瘍の本態といえるのが、がん細胞のもつ高い浸潤・転移能である。HGFは様々ながんに対して、浸潤・転移を強力に促すことから、HGF-Met受容体系はがんの浸潤・転移阻止につながる分子標的になると考えられている。したがって、HGF-Met受容体系を阻害する分子(HGF-Metアンタゴニスト)は、がんの浸潤・転移・成長阻害につながる新規制がん分子になる。また、矢野ら(金沢大学がん進展制御研究所)により、肺がんのイレッサ耐性獲得にHGF依存的なMet受容体の活性化が関与すること、イレッサとHGF-Met阻害の併用療法がイレッサ耐性の克服につながる事が示された。さらに、平尾ら(金沢大学がん進展制御研究所)により脳腫瘍(グリオブラストーマ)モデルでの腫瘍幹細胞の浸潤性成長にHGF-Met系の活性化が関与することが明らかにされた。これらの背景をふまえ、HGF-Met系阻害分子、とり

わけ、阻害分子としての独自性、医薬品としての汎用性、チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性出現を考慮すると、HGFとMet受容体の相互作用を細胞外で阻害する低分子化合物医薬は、独自性、汎用性、耐性出現が生じ難い点において優れた抗がん剤になる。

### 2. 研究の目的

本研究グループは、これまでががん研究所との共同研究の成果(平成20年度～23年度)として、また、独立法人医薬基盤研究所から保健医療分野における基礎研究推進事業(平成18年度～22年度)として支援を受け、HGF-Met系の活性化の分子機構に基づいてシグナル伝達を阻害する化合物創出に成功している。HGF(N-K1-K2-K3-K4-β鎖の各ドメインから成る)は、Metの細胞外ドメインと特有の幾何学的配置をもったヘテロ4量体を形成することで、細胞内キナーゼドメインが自己リン酸化し活性化する。細胞外で活性4量体を形成するには、①NK1-NK1相互作用、②NK1-Met相互作用、③HGFβ鎖-Met相互作用のすべてが必須である。我々は、タンパク質と結晶構造解析技術、インシリコ創薬技術などを利用することによって、結合力の最も弱い③を遮断するHGFアンタゴニスト化合物を探索し、がん細胞の浸潤機能を抑制する化合物を複数個得ている。さらにこ

れら化合物はイレッサ耐性に対して緩和傾向を示した。シード化合物の1つと HGFβ 鎖の X 線構造解析に基づいた Structure-Based Drug Design (SBDD) を行い、ベンゼン誘導体の最適化を図った。さらに、これまで手つかずであったサブサイトを利用した SBDD 最適化研究を進めて、HGF 阻害活性が飛躍的に向上した医薬品候補化合物を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

HGFβ-ベンゼン誘導体複合体の立体構造に基づいて HGFβ 鎖-Met 相互作用面のうち S2 サブサイトに作用するベンゼン誘導体を設計、合成した。さらに HGFβ-Met 複合体の立体構造に基づいて分子モデリングを行い、S1, S1' 及び S2 サブサイト (図1) に同時に作用するペプチド化合物を設計、合成した。得られた誘導体及び化合物は HGFβ 鎖-Met の結合阻害活性、HGF 依存的細胞 Scattering 作用に対する阻害活性、HGF 依存的 Met リン酸化活性阻害、及びがん細胞の浸潤阻害活性により評価した。

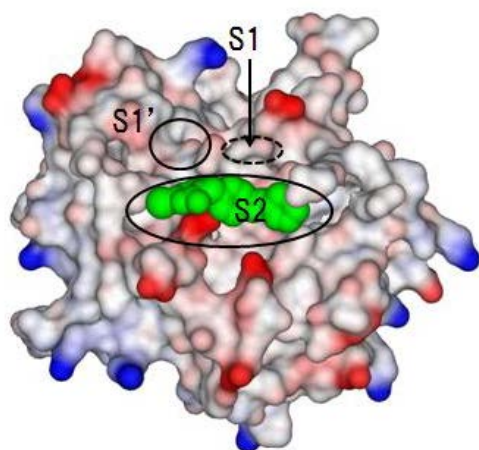


図1 HGFβのサブサイト

### 4. 研究成果

辺縁に正電荷及び負電荷を有するサブポケット (S2) を狙った Structure-Based Drug Design を行ったが、活性向上には至らなかった。このことから、S2 サブポケットを埋めるだけでは阻害活性を向上することができないことが示唆された。そこで、HGFβ-Met の相互作用に関わる他のサブポケット (S1, S1') を同時に阻害するペプチド性化合物を設計したが、これらは弱いながら阻害活性を示した。ペプチド性化合物は相互作用エネルギーを得ているが、コンホメーションに関連するエントロピーロスが想定以上に大きくなったと考えられる。今後、エントロピーロスを最小限化するためにコンホメーションを分子内で固定化した化合物を設計して高活性 HGF アンタゴニストの創出を目指す。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Y. Takashima, E. Mizohata, S.R. Krungkrai, Y. Fukunishi, T. Kinoshita, T. Sakata, H. Matsumura, J. Krungkrai, T. Horii, T. Inoue, The in silico screening and X-ray structure analysis and the inhibitor complex of *Plasmodium falciparum* orotidine-5'-monophosphate decarboxylase, *J. Biochem.* **152**,133-138 (2012).
2. T. Matsumoto, T. Kinoshita, H. Furukawa, R. Nakai, Y. Kirii, K. Yokota, T. Tada, Crystal structure of non-phosphorylated MAP2K6 in a putative auto-inhibition state, *J. Biochem.* **151**, 541-549 (2012).
3. T. Matsumoto, T. Kinoshita, Y. Kirii, T. Tada, A. Yamano, Crystal and solution structures disclose a putative transient state of mitogen-activated kinase kinase 4, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 195-200 (2012).
4. T. Nakaniwa, H. Fukada, T. Inoue, M. Gouda, R. Nakai, Y. Kirii, M. Adachi, T. Tamada, S. Segawa, R. Kuroki, T. Tada, T. Kinoshita, Seven cysteine-deficient mutants depict interplay between thermal and chemical stabilities of individual cysteine residues in MAP kinase JNK1, *Biochemistry* **51**, 8410-8421 (2012).

[学会発表] (計 8 件)

1. Binding energy estimation of CK2 inhibitors by the *ab initio*-based fragment molecular orbital method, T. Kure, S. Nakamura, M. Kanemitsu, K. Murata, K. Kitaura, T. Kinoshita, Z. Hou, Y. Suzuki, H. Ohno, S. Oishi, N. Fujii, Y. Takei, M. Yasue, R. Misu, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, I. Nakanishi, 22nd International Medicinal Chemistry Symposium, (Berlin, 2012)
2. Crystal and solution structures disclose a transient state of non-phosphorylated MAP2K4, T. Matsumoto, T. Kinoshita, Y. Kirii, T. Tada, A. Yamano, Asian Crystallographic Association 2012 conference AsCA12/CRYSTAL28, (Adelaide, 2012)
3. 「アザインドール骨格またはフェニルアゾール骨格を有する新規プロテインキナーゼ CK2 阻害剤の開発研究」 侯 増燁, 大石真也, 武井義則, 安江美里, 三須良介, 鈴木大和, 村田克美, 北浦和夫, 平澤 明, 辻本豪三, 大野浩章, 藤井信孝, 仲西功, 中村真也, 呉竜英, 木下 豊, 第 10 回次世代を担う有機化学シンポジウム (2012 年)

4. 「X線小角散乱を利用したタンパク質構造変化の視覚化」松本崇, 木下誉富, 山崎優, 中島良介, 多田俊治, 山口明人, 山野昭人, 第12回日本蛋白質科学会年会(2012年)
5. 「ヒトMAPキナーゼJNK1におけるシステイン残基の化学的安定性および熱安定性への関与」仲庭哲津子, 深田はるみ, 合田正貴, 中井良子, 桐井康行, 安達基泰, 玉田太郎, 黒木良太, 瀬川新一, 木下誉富, 第12回日本蛋白質科学会年会(2012年)
6. 「フェニルアゾール骨格を有する新規プロテインキナーゼCK2阻害剤の開発」侯増輝, 大石真也, 武井義則, 安江美里, 三須良介, 鈴木大和, 村田克美, 北浦和夫, 平澤明, 辻本豪三, 大野浩章, 仲西功, 中村真也, 呉竜英, 木下誉富, 藤井信孝, 第42回複素環化学討論会(2012年)
7. 「非経験的フラグメント分子軌道法を活用した高活性Protein Kinase CK2阻害剤の設計」呉竜英, 侯増輝, 木下誉富, 武井義則, 安江美里, 三須良介, 鈴木大和, 中村真也, 大野浩章, 村田克美, 北浦和夫, 平澤明, 大石真也, 藤井信孝, 仲西功, 第40回構造活性相関シンポジウム(2012年)
8. 「受容体チロシンキナーゼFGFR3のX線結晶構造解析」藤井翔太, 力津朗, 桐井康行, 合田正貴, 多田俊治, 木下誉富, 平成24年度日本結晶学会年会(2012年)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

1. 構造生物学と創薬、木下誉富、第3回和漢研・がん研ジョイントセミナー「アカデミア創薬の心・技・体」(2013年2月、金沢)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大阪府立大学大学院理学系研究科・准教授  
木下誉富

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍動態制御・教授 松本邦夫