

XIAP アンタゴニストの *in silico* 分子設計による新規制がん剤  
リード化合物の創製

所属機関 東京理科大学薬学部  
研究者名 田沼靖一

## 《研究の概要》

アポトーシス抑制因子である XIAP は、アポトーシス実行因子である Caspase 活性を阻害することによって細胞のがん化に関与する、いわゆる発がんタンパク質因子であり、肺がんやメラノーマなどの多くのがん細胞で高発現している。また、その高発現が制がん剤や放射線療法に対する抵抗性と密接に関係していることが示されている。このような視点から、現在、XIAP は新規制がん剤開発の有力な創薬ターゲットタンパク質として注目されている。

XIAP の作用機序は、主に分子内の BIR3 ドメインで活性型 Caspase-9 に結合することによってアポトーシスの実行開始を阻害することである。一方、アポトーシス促進因子として同定された Smac/DIABLO (以下、Smac) は、この相互作用部位に結合することによって、XIAP の阻害効果を解除する。これらの知見に基づいて私共は、本研究助成により、XIAP 分子中の Smac 結合ポケットに対して Smac 様の抑制活性をもつ低分子化合物 (XIAP アンタゴニスト) を創製し、新たなメカニズムによる新規制がん剤を開発するためのリード化合物を創製することを目的とした。

これまでに私共は、独自に開発した *in silico* 分子設計手法 (COSMOS 法) を用いて、XIAP/Smac 結合部位を創薬ターゲットドメイン (Hot Spot) として、XIAP 阻害剤 (アンタゴニスト) となる最適ペプチド配列 AVPF を同定し、本研究初年度 (平成 21 年度) において、この AVPF を低分子化合物に変換設計することにより、新規 XIAP アンタゴニストリード化合物 ITM-017 を見出すことに成功した。

継続研究 2 年目 (平成 22 年度) においては、そのうちの一つである ITM-017 の構造を基に SBDD (Structure Based Drug Design) を行うことによって最適化を実施し、さらに XIAP 阻害能の高い最適リード化合物の創製を行った。その結果、*in vitro* の系での XIAP アンタゴニスト活性の高い化合物として、TEST1-2, TEST1-6 を得ることができたが、培養がん細胞株での効果 ( $EC_{50} = 20 \sim 40 \mu\text{M}$ ) は、期待されるほど強いものではなかった。おそらく、細胞膜透過性や細胞内での存在形態が悪いことによると推察される。

そこで、他の母核を用いて SBDD を実施し、最適リード候補化合物 (XIAP-125) の分子設計を行った。本化合物は、かなり良好な XIAP 結合様式及び細胞膜透過性が予測される。よって今後は、本化合物の *in vitro* XIAP 阻害評価、培養がん細胞株でのアポトーシス誘導能、及び、担がん動物を用いた抗腫瘍効果の検証を行い、臨床応用への早期展開を目指す。

本研究における *in silico* 創薬戦略の実践は、学術的にも社会的にも重要な意義をもち、製薬業界並びに医療産業の発展・強化への波及効果が期待される。

田沼 靖一	東京理科大学薬学部 教授	XIAP アンタゴニストの <i>in silico</i> 分子設計
高澤 涼子	東京理科大学薬学部 助教	XIAP アンタゴニストの <i>in vitro</i> 活性評価
阿部 英明	東京理科大学薬学部 客員研究員	XIAP アンタゴニストの <i>in vivo</i> 活性評価

## 研究報告

### I 研究目的

近年、細胞のアポトーシス抵抗性獲得が、発がんに大きな影響力をもつ過程として重要視されており、がん細胞が獲得したアポトーシス抑制能が制がん戦略の重要な創薬ターゲットとなっている。XIAP はアポトーシス実行因子である Caspase 活性を阻害するタンパク質因子（アポトーシス抑制因子）であり（図 1）、肺がんやメラノーマなどの多くのがん細胞で高発現している。また、その高発現が制がん剤や放射線療法に対する抵抗性と密接に関係していることが示されている。このような視点から、現在、XIAP は新規制がん剤開発の有力な創薬ターゲットタンパク質として注目されている。

私共はこれまでに、XIAP に結合してその阻害活性を抑制する内在性タンパク質因子 Smac/DIABLO（以下 Smac）のミトコンドリアからの放出が、アポトーシスへの経路決定に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また興味深いことに、XIAP 高発現のがん細胞では XIAP によって阻害される Caspase も高発現していることが観察されている。これらの事実から、XIAP の過剰発現によるアポトーシス抑制のブレーキを解除して、がん細胞に高発現している Caspase の活性化を容易に惹起できるようにすることによって、アポトーシス誘導を可能とする低分子化合物が有効な制がん剤となり得ると考えられる。つまり、XIAP 分子中の Smac 結合ポケットに対して Smac 様の抑制活性をもつ低分子化合物（XIAP アンタゴニスト）の創製が、新たなメカニズムによる新規制がん剤の開発につながるという考えである（図 1）。

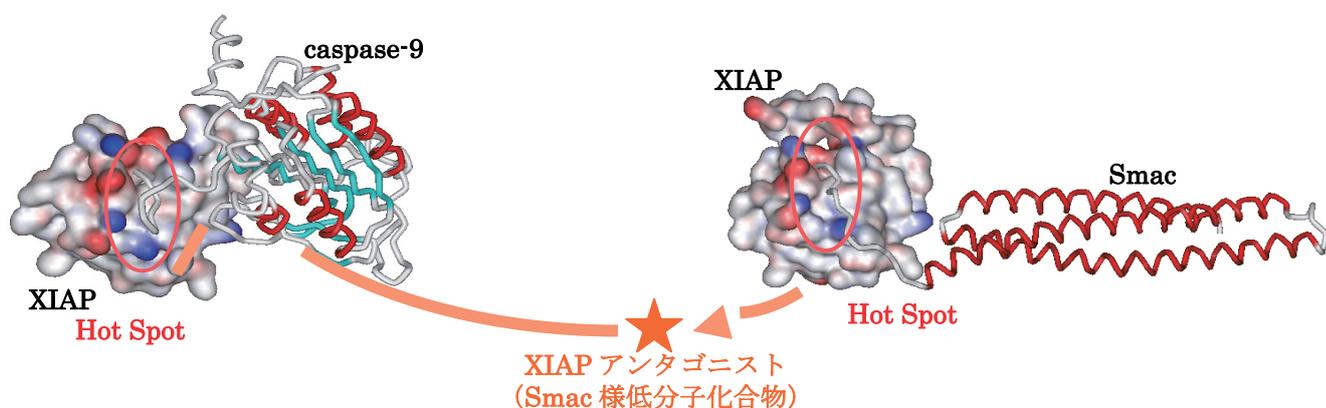


図 1 XIAP/caspase-9 及び XIAP/Smac 相互作用部位と XIAP アンタゴニスト開発の概略

私共は、その一方でこれまでに、タンパク質間相互作用を標的とした新しい創薬方法論とそれを実装する新しい *in silico* 分子設計手法の開発を行っている。その一つの創薬戦略、COSMOS 法のコンセプトは、「創薬ターゲットタンパク質の活性/制御部位 (Hot Spot) に対して相互作用する最適結合ペプチドを *in silico* で網羅的にスクリーニングすることによって同定し、その結合立体配座をミミックする低分子化合物への変換設計を行い、最後に *in silico* で自動最適化する」というものである (図 2)。この新しい方法論を実装するための *in silico* 分子設計手法として、最適ペプチド設計 → 低分子変換設計 → 低分子最適化設計を可動させるための新しいアルゴリズムによるソフトウェアの開発を行った。私共はこの手法を用いて、XIAP/Smac 結合部位を創薬ターゲットドメイン (Hot Spot) として、XIAP 阻害剤 (アンタゴニスト) となる最適ペプチド配列 AVPF をすでに同定している。これを低分子化合物に変換設計することにより、新規制がん剤リード化合物を開発することが本研究の目的である。

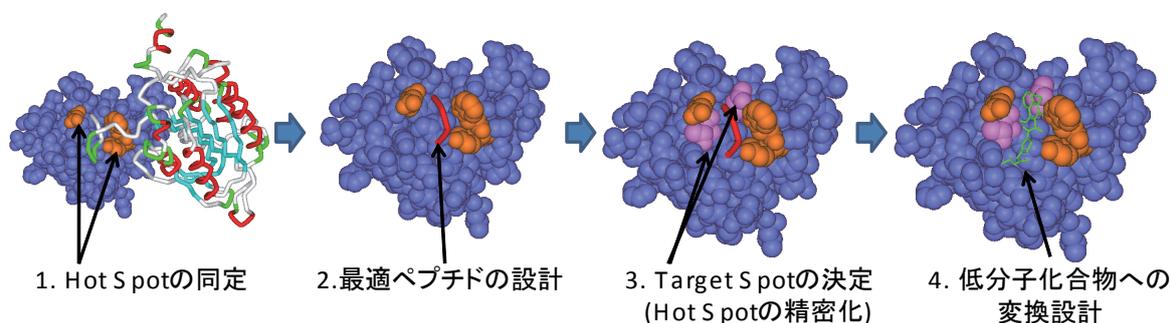


図 2 新しい *in silico* 創薬戦略 COSMOS 法の内容

## II 研究計画及び材料と方法

### 1. XIAP アンタゴニストペプチド AVPF/XIAP 結合に重要なアミノ酸残基 (Hot amino acids) の同定

XIAP への Smac の結合には、その N 末端の Ala が必須であることが明らかとなっている。これまでに、XIAP 結合モチーフを A-X-X-X (X : 任意の 20 種アミノ酸) とし、Smac の N 末端 4 アミノ酸残基を mimic する XIAP 阻害ペプチドを、本研究室で開発した *in silico* 分子設計手法 (COSMOS 法) を用いて設計した。予測結合親和性の高い XIAP アンタゴニストペプチドについて阻害効果を実測し、最適ペプチド配列として AVPF を同定した。本研究では、AVPF/XIAP 相互作用について、*in silico* で結合エネルギーの Decomposition analysis を行い、この相互作用に重要な XIAP 側のアミノ酸残基 (Hot amino acids) を同定する。この Hot amino acids を支点として、XIAP アンタゴニスト低分子化合物設計のための pharmacophore を構築する。

### 2. XIAP アンタゴニストペプチドの低分子化合物への変換設計

上記手法で設計されたペプチドの結合配座 (pharmacophore) は、低分子有機化合物を設計する上で重要な情報となる。私共はすでにペプチド/Caspase の結合様式パターンと低分子化合物/Caspase の結合様式パターンとを定量的に評価し比較する新しい手法、結合エネルギー分布度類似評価法 (Mimetics Rate (MR)法) の開発に成功している。この MR 法の概要は、購入可能な化合物ライブラリ (数百万化合物) の中から、最適ペプチドの結合エネルギー分布度の類似性を評

価することによって、最適ペプチドの結合配座をミミックする低分子化合物を選定するというものである。この手法によって選定された化合物を購入し、活性測定を行い、活性を示した化合物をコンピュータ上で重ね合わせて解析することによって母核をまず抽出する。この母核に対して種々の官能基をつけて化合物をコンピュータ上に発生させ、XIAP の Hot Spot との Docking Study によって新規 XIAP アンタゴニスト候補化合物を設計し、化学合成を行う。

### 3. XIAP アンタゴニスト低分子化合物の結合親和性の評価

2.で創製した XIAP アンタゴニスト低分子化合物について、結合親和性 (Kd 値) を一分子蛍光分析システムによる蛍光偏光測定によって実測する。この手法では分子の固相化を必要とせず、分子が自由に活動できる溶液中で測定が可能である。ただし、蛍光標識したプローブが必要である。Smac の N 末 7 アミノ酸残基の C 末端を TAMRA 標識した AVPIAQK-TAMRA をプローブとし、リコンビナント XIAP と AVPIAQK-TAMRA との結合に対する各ペプチドの競合阻害解析を行う。さらに、HEK293 細胞抽出液に cytochrome *c* 及び dATP を添加することによる Caspase-9 → Caspase-3 活性化系を用いた *in vitro* functional assay を用いて、XIAP アンタゴニスト低分子化合物の XIAP 阻害活性を検証する。

### 4. XIAP アンタゴニスト低分子化合物の *in vitro* アポトーシス誘導能及び作用機序の解析

種々の培養ヒトがん細胞株を用いて、XIAP アンタゴニスト低分子化合物のアポトーシス誘導能の特性について、制がん剤に対する感受性の増強及び正常細胞への傷害性の面から検証する。また、その細胞レベルでの作用機序の解明として、Caspases の活性化等について解析する。

### 5. XIAP アンタゴニスト低分子化合物の *in vivo* アポトーシス誘導能の検証

4.で評価された XIAP アンタゴニスト低分子化合物の抗腫瘍効果について、担がん動物を用いた *in vivo* 動物実験モデルを用いて個体レベルで検証する。そのデータを基に制がん剤としてのリード化合物の最終的な評価を行う。また、*in vivo* での制がん効果を分子設計にフィードバックすることによって、該 XIAP アンタゴニスト候補化合物の構造に対して *in vivo* 最適化を検討する。

## III 研究成果

私共は、独自に開発した *in silico* 分子設計手法 (COSMOS 法) を用いて、XIAP/Smac 結合部位を創薬ターゲットドメイン (Hot Spot) として、XIAP 阻害剤 (アンタゴニスト) となる候補ペプチドを設計し、その実測結果から最適ペプチドとして AVPF を同定した。本研究初年度 (平成 21 年度) は、この AVPF を低分子化合物に変換設計することにより、新規制がん剤リード化合物を開発することを目的として研究を行った (図 3)。

まず、XIAP 最適アンタゴニストペプチド AVPF と XIAP との相互作用に重要なアミノ酸残基 (Hot amino acids) について、*in silico* で結合エネルギーの Decomposition analysis を行い、4 つの結合サイト (S1, S2, S3, S4) おける Hot amino acids として、E314 (S1 ポケット), D309, T308 (S2 ポケット), W323 (S3 ポケット), G306, K299 (S4 ポケット) を同定した (図 4)。S1, S2 ポケットについては親水性アミノ酸側鎖との水素結合が、S3, S4 ポケットについては疎水性相互作用が重要であると予測される。この Hot amino acids を支点として、XIAP アンタゴニ

スト低分子化合物設計のための pharmacophore を構築し、我々が開発した結合エネルギー分布度類似評価法 (Mimetics Rate (MR)法) を用いて化合物ライブラリ (約 300 万化合物) からスクリーニングを行った。選出された化合物群について、蛍光偏光測定を用いて XIAP-BIR3 への結合能の評価を行った結果, XIAP-BIR3 結合能を有する化合物 ITM-017 を見出すことができた (図 5)。

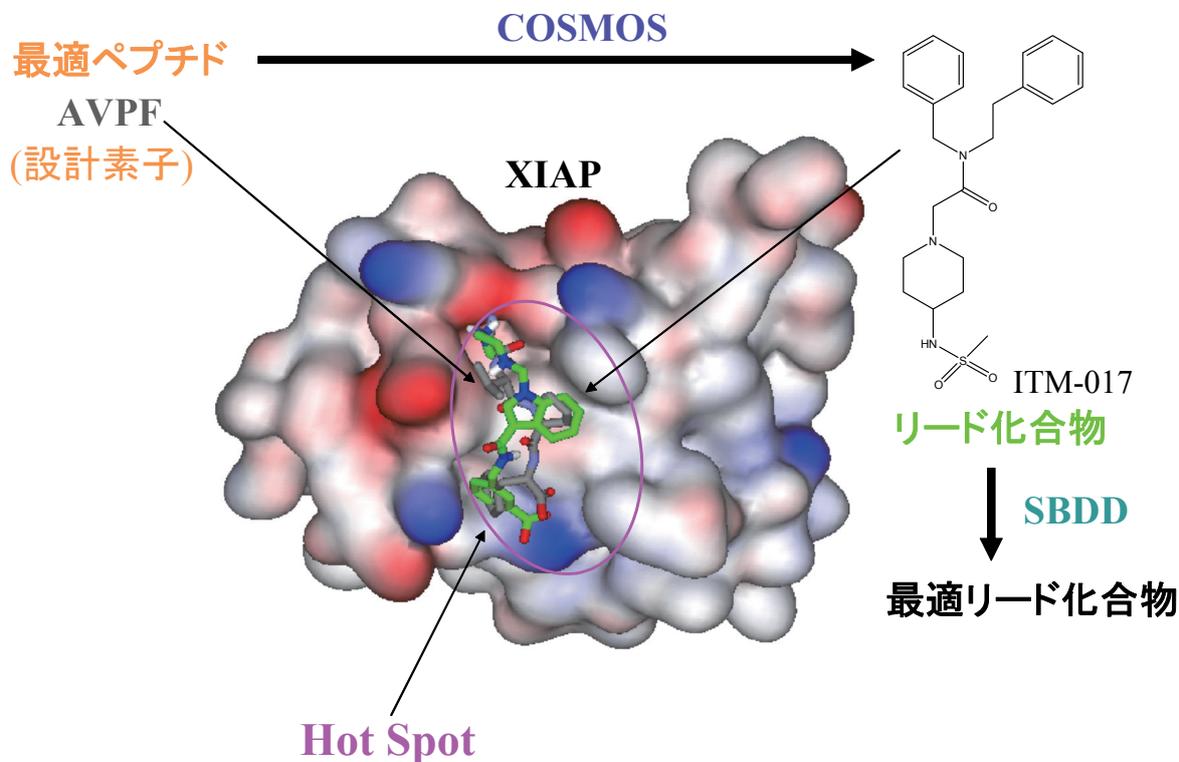


図 3 COSMOS 法による新規 XIAP アンタゴニストの創製概要

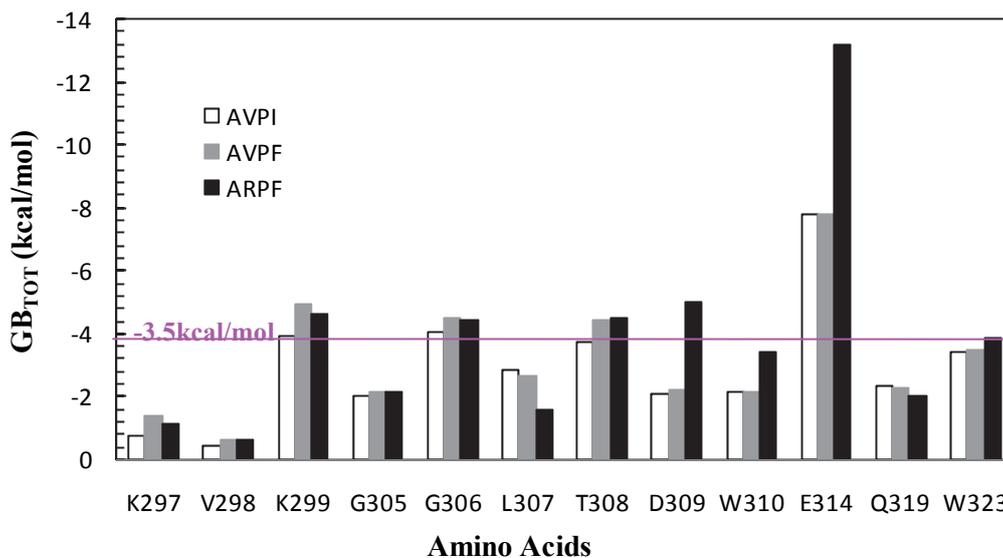


図 4 Decomposition analysis による Hot amino acids 同定

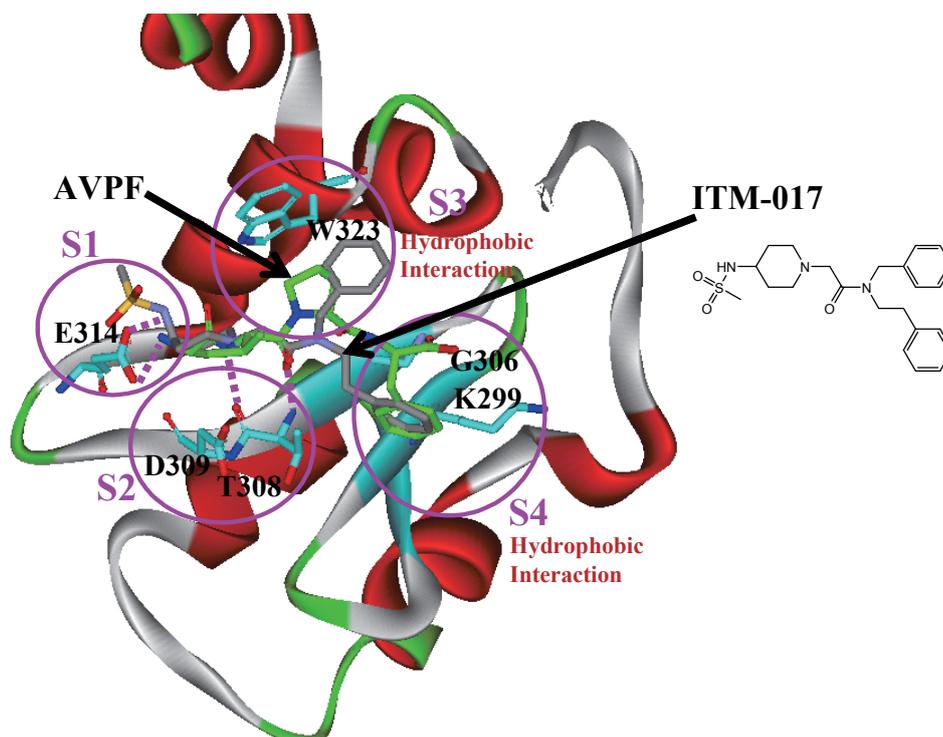


図5 AVPF/XIAP 結合様式と ITM-017/XIAP 結合様式の重ね合わせ

またこの ITM-017 は、白血病細胞株 HL-60 細胞に対してアポトーシス誘導効果を有することが判明した (図 6)。

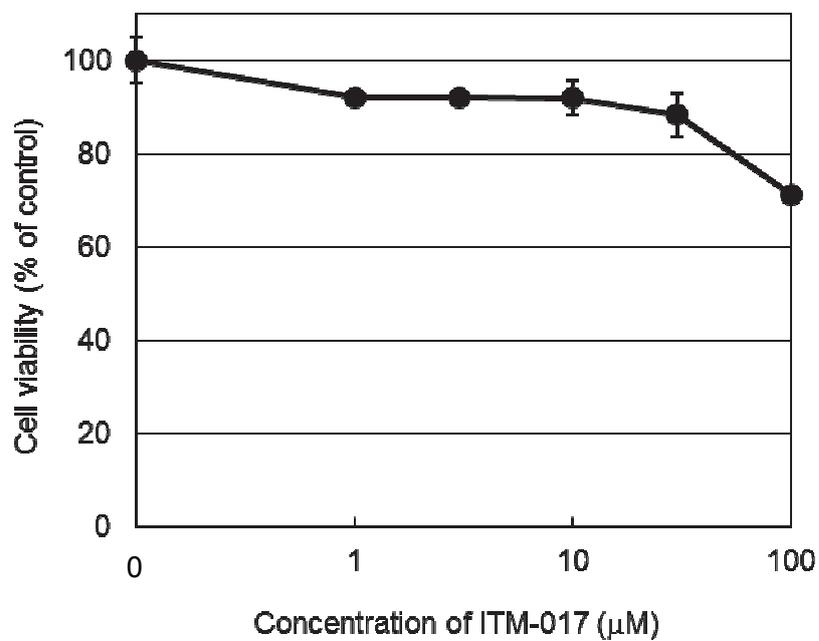


図6 ITM-017 の HL-60 細胞生存率への効果

#### IV 考察

ITM-017 の XIAP Hot Spot 内の S1~S4 ポケットにおける結合様式を考察すると, S1, S2 ポケットにおける水素結合, 及び S3, S4 ポケットにおける疎水性相互作用を満たしており, 基本骨格としては優れているといえる. しかし, S1 ポケットにおいて ITM-017 末端の硫酸基が突出しており, これが XIAP との結合にマイナスの影響を及ぼすことが予測され, さらなる構造最適化が必要と考えられる.

そこで, この結合様式を基に, 私共が開発した *in silico* 自動化最適化法を用いて XIAP アンタゴニスト最適候補化合物の分子設計を行った. 2つの最適候補化合物の設計を行い (図 7), それらの結合親和性について MD Docking Study (図 8) を用いて詳細な検討を行った.

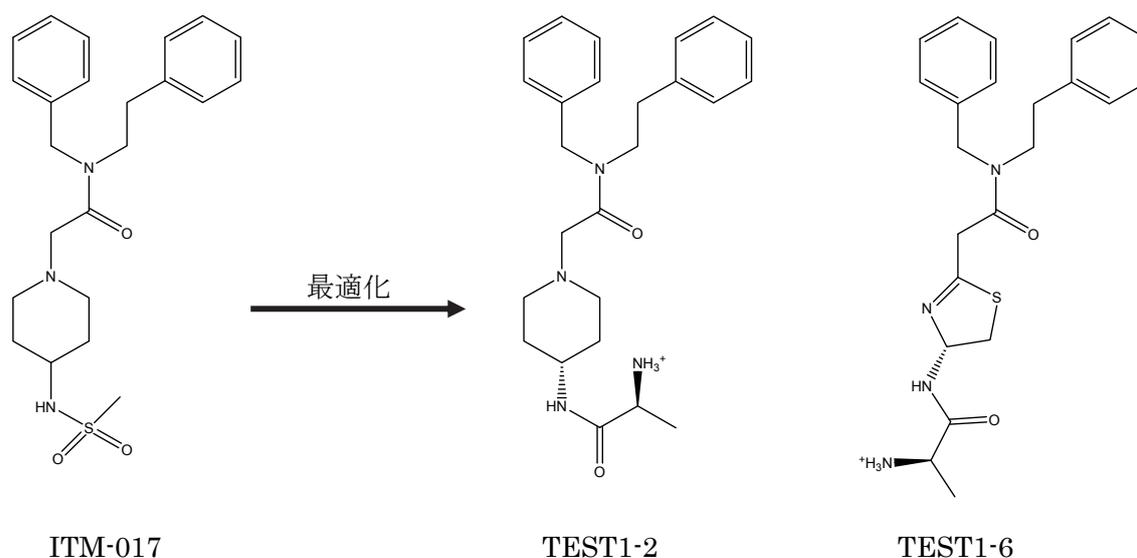


図 7 新規 XIAP アンタゴニスト最適候補化合物

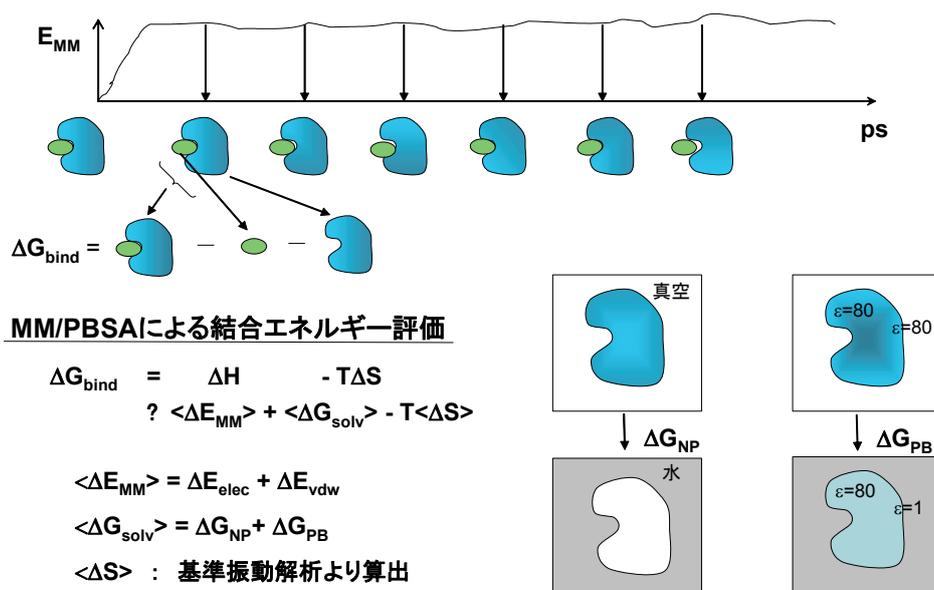


図 8 MD Docking Study

TEST1-2, TEST1-6の結合様式を *in silico* で解析したところ、いずれも良好な結合様式をとり、結合親和性も ITM-017 に比べ 2 オーダー強いことが予測された。例として TEST1-6 の XIAP に対する結合様式を図 9 に示す。

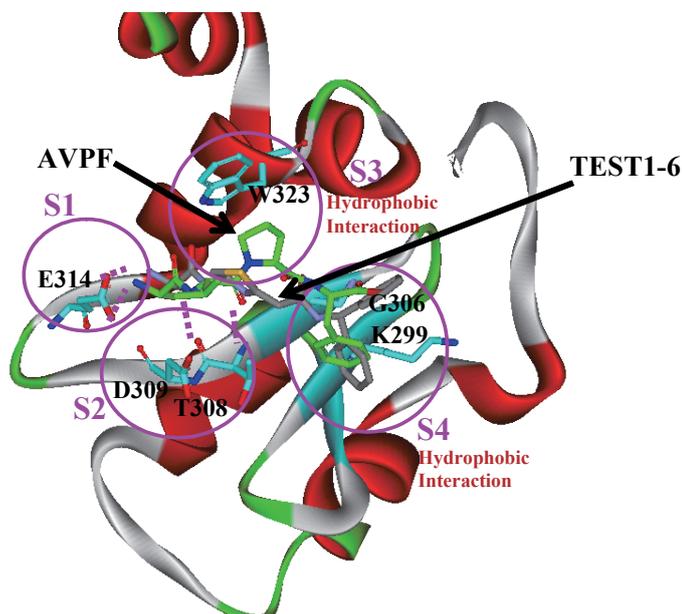


図 9 TEST1-6/XIAP 結合様式

これら 2 つの化合物について、培養がん細胞株での効果を検証したところ、期待されるほど強いものではなかった ( $EC_{50} = 20 \sim 40 \mu M$ )。おそらく、細胞膜透過性や細胞内での存在形態が悪いことによると推察される。

そこで、他の母核を用いて SBDD を実施し、最適リード候補化合物 (XIAP-125) の分子設計を行った。本化合物は、かなり良好な XIAP 結合様式及び細胞膜透過性が予測される。よって今後は、本化合物の *in vitro* XIAP 阻害評価、培養がん細胞株でのアポトーシス誘導能、及び、担がん動物を用いた抗腫瘍効果の検証を行い、臨床応用への早期展開を目指す。

本研究における *in silico* 創薬戦略の実践は、学術的にも社会的にも重要な意義をもち、製薬業界並びに医療産業の発展・強化への波及効果が期待される。

## V 研究成果の発表

1. Takasawa R, Saeki K, Yoshimori A, Tanuma S.: Discovery of a novel scaffold for development of XIAP antagonists. *in preparation*.
2. Zhou B, Ikejima T, Watanabe T, Iwakoshi K, Idei Y, Tanuma S, Uchiumi F.: The effect of 2-deoxy-D-glucose on Werner syndrome RecQ helicase gene. *FEBS Lett.* 583 (2009) 1331-6
3. Mizuta R, Mizuta M, Araki S, Suzuki K, Ebara S, Furukawa Y, Shiokawa D, Tanuma S, Kitamura D.: DNase gamma-dependent and -independent apoptotic DNA fragmentations in Ramos Burkitt's lymphoma cell line. *Biomed Res.* 30 (2009) 165-70
4. Fujihara H, Ogino H, Maeda D, Shirai H, Nozaki T, Kamada N, Jishage K, Tanuma S,

- Takato T, Ochiya T, Sugimura T, Masutani M. : Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase Deficiency Sensitizes Mouse ES Cell to DNA Damaging Agents **Current Cancer Drug Targets.** 9 (2009) 953-962
5. Uchiumi F, Higami Y, Tanuma S. : Regulations of Telomerase Activity and WRN Gene Expression in: A.N.Gagnon (Ed.), *Telomerase*, **Nova Science Publishers.** (2009) 1-9
  6. Kobayashi T, Yoshimori A, Kino K, Komori R, Miyazawa H, Tanuma S. : A New small molecule that directly inhibits the DNA binding of NF- $\kappa$ B **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 17 (2009) 5293-5297
  7. Okita N, Ashizawa D, Ohta R, Abe H, Tanuma S. : Discovery of novel poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitors by a quantitative assay system using dot-blot with antipoly(ADP-nibose). **Biochem Biophys Res Commnu.** 392 (2009) 485-9
  8. Uchiumi F, Watanabe T, Tanuma S. : Characterization of various promoter regions of the human DNA helicase-encoding genes and identification of duplicated ets (GGAA) motifs as an essential transcription regulatory element. **Exp Cell Res.** 316 (2010) 1523-34
  9. Uchiumi F, Enokida K, Shiraishi T, Masumi A, Tanuma S. : Characterization of the promoter region of the human IGHMBP2 (Smubp-2) gene and its response to TPA in HL-60 cells. **Gene.** 463: 8-17 (2010).
  10. Nakajima H, Mizuta N, Sakaguchi K, Fujiwara I, Yoshimori A, Magae J, Tanuma S. : Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis in HER2-overexpressing human breast cancer cells by a pertuzumab mimetic peptide, HRAP. **J Biosci Bioeng.** 110: 250-3 (2010).
  11. Takasawa R, Saeki K, Tao A, Yoshimori A, Uchiro H, Fujiwara M, Tanuma S. : Delphinidin, a dietary anthocyanidin in berry fruits, inhibits human glyoxalase I. **Bioorg Med Chem.** 18: 7029-33 (2010).
  12. Okita N, Ohta R, Ashizawa D, Yamada Y, Abe H, Abe T, Tanuma S. : Bacterial production of recombinant human poly(ADP-ribose) glycohydrolase. **Protein Expr Purif.** 75: 230-5 (2010).
  13. Takahashi S, Kamiya T, Saeki K, Nezu T, Takeuchi S, Takasawa R, Sunaga S, Yoshimori A, Ebizuka S, Abe T, Tanuma S. : Structural insights into the hot spot amino acid residues of mushroom tyrosinase for the bindings of thujaplicins. **Bioorg Med Chem.** 18: 8112-8 (2010).
  14. Yamada Y, Fujii T, Ishijima R, Tachibana H, Yokoue N, Takasawa R, Tanuma S. : The release of high mobility group box 1 in apoptosis is triggered by nucleosomal DNA fragmentation. **Arch Biochem Biophys.** 506:188-93 (2010)
  15. Yamada Y, Fujii T, Ishijima R, Tachibana H, Yokoue N, Takasawa R, Tanuma S. : DR396, an apoptotic DNase  $\gamma$  inhibitor, attenuates high mobility group box 1 release from apoptotic cells. **Bioorg Med Chem.** 19:168-171(2011)
  16. Uchiumi F, Watanabe T, Hasegawa S, Hoshi T, Higami Y, Tanuma S. : The effect of

resveratrol on the werner syndrome RecQ helicase gene and telomerase activity.  
**Current Aging Science** 4:1-7(2011)

17. **Saeki K, Machida M, Kinoshita Y, Takasawa R, Tanuma S.** :Glycogen synthase kinase-3  $\beta$  2 has lower phosphorylation activity to tau than glycogen synthase kinase-3  $\beta$  1 **Biol Pharm Bull.** 34:146-9(2011)
18. **Saeki K, Nose Y, Hirao N, Takasawa R, Tanuma S.** : Amyloid Precursor Protein Binding Protein Fe65 Is Cleaved by Caspases during DNA Damage-Induced Apoptosis. **Biol Pharm Bull.** 34:290-4(2011)
19. **Takasawa R, Tao A, Saeki k, Shionozaki N, Tanaka R, Uhiro H, Takahashi S, Yoshimori A, Tanuma S.** :Discovery of a new type inhibitor of human glyxalase I by myrietin-based 4-point pharmacophore. **Bioorg Med Chem Lett.** (2011) in press