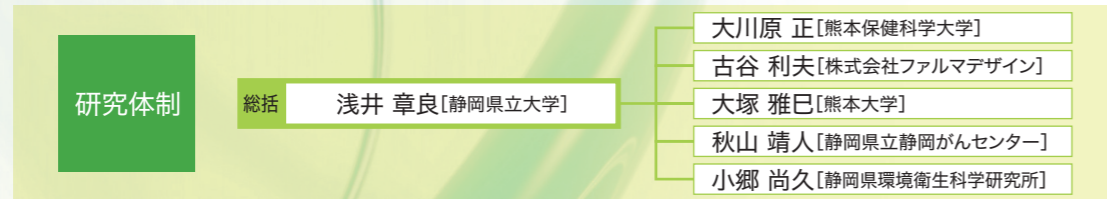
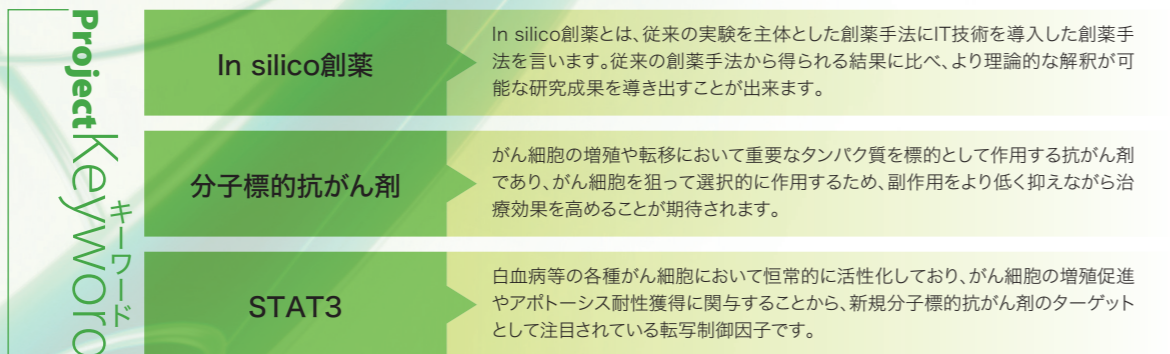


# In silico創薬技術を活用した 転写因子阻害作用を有する新規抗がん剤の創製

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)



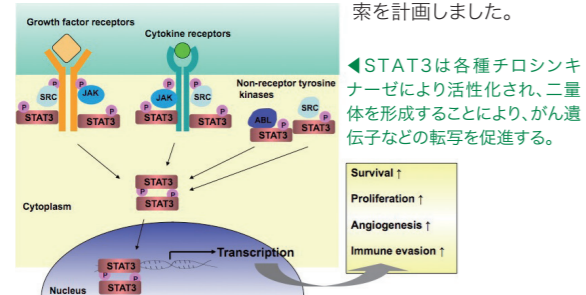
## インシリコ創薬による新規抗がん剤の開発



### 1 研究の背景・意義

#### 新しい創薬手法によるがん治療薬開発

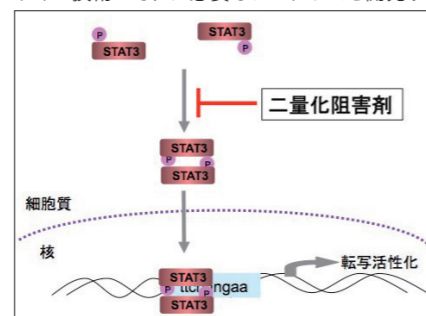
STAT3は乳がん、前立腺がん、白血病等の各種がん細胞で恒常的に活性化しており、がん細胞の増殖促進やアポトーシス耐性獲得に関与することから、新規分子標的抗がん剤のターゲットとして注目されている転写制御因子です。IL-6等のサイトカインやEGF等の成長因子が各レセプターに結合すると、レセプターのチロシン残基のリン酸化によりJAK、Srcチロシンキナーゼが活性化されます。これらチロシンキナーゼによりSTAT3のTyr705がリン酸化され、STAT3のC末端に存在するSH2ドメインを介して二量体を形成した後に核内に移行し、Cyclin D1、c-Myc、Survivinなどのがん遺伝子の転写を促進することが知られています。本研究では、新しいタイプのSTAT3二量体化阻害剤の創製を目指しています。STAT3二量体化阻害剤としては、これまでに主にペプチド性阻害剤が報告されていますが、がん細胞内への透過性や安定性が課題となっています。従って、STAT3二量体化阻害活性を有する低分子化合物は、新規分子標的薬として、さらにはSTAT3の細胞内における機能を解析するためのツールとしても極めて有用です。そこで、独自の創薬プログラムを開発することによりフラグメントリンキング法を用いて標的分子であるSTAT3のSH2ドメインに直接作用することにより、二量体化の形成を阻害する低分子化合物の探索を計画しました。



### 2 研究プロジェクトの目標

#### 創薬プログラムの開発とがん治療薬の創出

本研究では、標的分子であるSTAT3のSH2ドメインに直接作用することにより、二量体化の形成を阻害する低分子化合物の探索を計画しました。STAT3の場合、既にそのタンパク質自体の高次構造が明らかにされており、その立体構造からは、分子表面に深く明瞭な薬剤結合ポケットがないため、従来の構造ベースの創薬手法(SBDD)が適用しがたい標的と位置付けられます。そこで、本標的タンパク質のように浅いポケットに結合するフラグメント分子を、適当なリンカーで結合することにより、活性の高い分子を設計するための技術として新規プログラムを開発することによって、効率的かつ効果的にSTAT3阻害作用を有する新規抗がん剤の創製が達成され、さらに、薬物設計分野での大きな波及効果をもたらすことが期待されます。従って、in silico創薬手法によりSTAT3阻害作用を有する新規抗がん剤を創製することを目的とし、以下の2点を到達目標としました。①STAT3のSH2ドメインのように、深い結合ポケットが無いような標的タンパク質にも適用できる医薬品デザイン技術とそれに必要なプログラムを開発すること。②STAT3



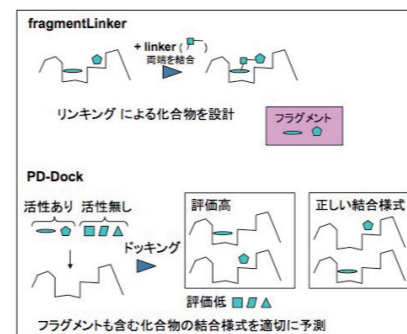
▲新規なin silico創薬プログラムを活用して効率的かつ効果的にSTAT3二量体化阻害作用を有する分子標的抗がん剤を創出する。

阻害を作用機序とする新規抗がん剤の臨床開発候補化合物を5年以内に見出すこと。

### 3 研究プロジェクトの成果

#### 2種の新規in silico創薬プログラムを開発

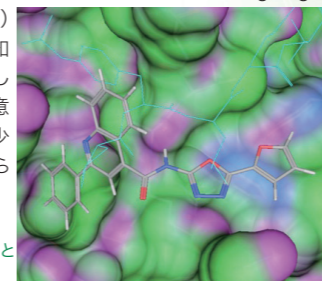
近年注目されているフラグメントに基づくリード創出(シンプルな構造のフラグメントから出発して医薬品候補化合物を設計する方法)に有用な2種のプログラム「fragmentLinker」と「PD-Dock」の開発を行いました。「fragmentLinker」は、2つの異なる結合部位に結合するフラグメント同士を別の分子(リンカー)で結合し、より活性の高い新たな分子へと導くリンキングと呼ばれる手法を自動的に行うプログラムです。本プログラムは、活性データが既知のアセチルコリンエステラーゼ等の事例の検証で、適切なリンカーを正しく予測する事を確認しております。「PD-Dock」は、シンプルな構造であるフラグメントの結合様式も適切に評価可能にするため、汎用的なDockingプログラムでは考慮されていない弱い相互作用もスコア関数に入れた新規ドッキングプログラムで、個々の標的毎にパラメーターを最適化し特化したスコア関数(ターゲット・フォーカスト スコア)の作成機能を有する事を特徴とします。「PD-Dock」は、複数の複合体構造に対するドッキング精度検証の結果、既存のプログラムと同等もしくはそれ以上の精度で結合様式を予測し、既知PKB阻害剤のターゲット・フォーカストスコアを用いたバーチャルスクリーニングの例で、高い濃縮率で既知阻害剤を選別したことから、その有用性を確認しました。



#### 経口投与可能なSTAT3二量体化阻害剤STX-0119

STAT3-SH2ドメイン構造を用いたバーチャルスクリーニングを実施し、市販化合物ソースより1) DOCK4、2) Glide、3) 既存SH2リガンドとの構造類似性により合計633化合物を選択、収集しました。一方、生化学的なアッセイ系として、1) STAT3恒常的活性化型がん細胞株に対して選択的な増殖阻害を指標とした系、2) SPRによるSTAT3-SH2ドメイン相互作用を指標とした系、3) ルシフェラーゼレポーター系による細胞内STAT3転写活性阻害を指標にした系、4) アルファスクリーン法によるSTAT3選択的二量体化阻害を指標とした系を構築しました。これらのアッセイ法を活用し、バーチャルスクリーニングにより選抜された化合物群からの絞込みを実施し、3種類の異なる骨格のリード候補化合物を同定し、その合成ルートを確立しました。中でもSTX-0119は細胞内においてもSTAT3の二量体化阻害により、選択的にSTAT3の機能を阻害することが確認されています。さらにヒトリンパ腫SCC-3のヌードマウス移植固形腫瘍モデルにおける薬効評価の結果、STX-0119は経口投与(40mg/kg～160mg/kg、5日間連続投与)で強力なJAK2阻害剤として知られているWP-1066と比較して、同等またはそれ以上の有意な抗腫瘍活性を示し、体重減少などの明らかな副作用は認められませんでした。

▶STAT3のSH2ドメインとSTX-0119の結合モデル

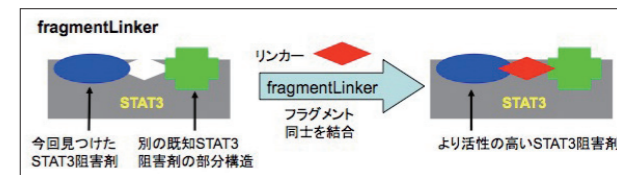


### 4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

#### In silico創薬プログラムの応用と改良

開発した2種のin silico創薬プログラム(fragmentLinker, PD-Dock)は、それぞれ検証を行い、fragmentLinkerについては、活性データが既知のアセチルコリンエステラーゼ等の事例に対する適切なリンカーの予測、PD-Dockについては、複数の複合体での結合様式予測と既知PKB阻害剤を例にターゲット・フォーカストスコアを用いたバーチャルスクリーニングで有用性を確認しました。

今後は、本プロジェクトにおける更なる実用化に向け、検証例の追加とプログラムの改良を行います。fragmentLinkerについては、本プロジェクトの標的タンパクのSTAT3の二量体化を阻害する薬剤の探索に適用し、評価と検討を繰り返しております。具体的にはバーチャルスクリーニングで見つけたSTAT3阻害剤をフラグメントとし、別の既知STAT3阻害剤の阻害活性に重要な部分構造をもう一つのフラグメントとして、fragmentLinkerにより適切なリンカーで結合した化合物をデザインし、化合物合成を行いより活性の高い阻害剤を探索しております。PD-Dockについては、検証例を更に追加してその有用性を確認するとともに精度向上のための検討も行い、フラグメントに対しての有用性についての検証と改良を行っていく予定です。



▲STAT3阻害剤ヒット化合物の活性向上に向けた新規in silicoプログラムfragmentLinker適用の模式図

#### 活性増強と開発候補の選定

バーチャルスクリーニングによる選抜と、その後の生化学的なアッセイ系による絞り込みによって、経口投与で抗腫瘍活性を示すリード化合物STX-0119を見出してきました。細胞レベルでの生化学的な解析からSTX-0119は、がん細胞内でSTAT3の二量体化を選択的に阻害する薬剤であることが検証されています。STAT3二量体化阻害を作用機序とする薬剤で経口投与可能な化合物はこれまでに報告がありません。今後は上記in silico創薬プログラムをフルに活用して、より低投与量で抗腫瘍活性を示す化合物をデザイン、合成していきます。既にin vitroでの活性が10倍程度増強した誘導体を数種類得ておりますので、これら誘導体の抗腫瘍活性評価を進めていきます。リード化合物自身については数十グラムスケールでの効率的な合成法を既に確立していることから、引き続き、この化合物の投与形態、投与スケジュールの最適化、さらには詳細な毒性評価を行っていきます。適応がん種に関しても、今のところはSTAT3が恒常的に活性化している各種リンパ腫をひとつのターゲットとしていますが、今後は有用なバイオマーカーの探索も進めながら乳がんなど固形腫瘍への効果を検討していく予定です。



参考文献

H. Yu and R. Jove, "The STATs of Cancer – New Molecular Targets Come of Age." Nature reviews cancer, 4, 97-105 (2004)

高橋理, "FBDDのためのin silicoアプローチ", SAR News No.15 17-20 (Oct. 2008)

Uehara Y, Mochizuki M, Matsuno K, Haino T, Asai A. "Novel high-throughput screening system for identifying STAT3-SH2 antagonists." Biochem Biophys Res Commun. 380, 627-631(2009)