

別添 1

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「大量構造計算とゲノムバイオマーカーを取り入れたin vivoスクリーニングによる生理的肝代謝系で効果の高いβカテニン阻害剤の開発」

平成24～25年度 総合研究報告書

研究代表者 石川 俊平

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総合研究報告 「大量構造計算とゲノムバイオマーカーを取り入れたin vivoスクリーニングによる生理的肝代謝系で効果の高いβカテニン阻害剤の開発」 石川俊平	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 4

「大量構造計算とゲノムバイオマーカーを取り入れたin vivoスクリーニングによる生理的肝代謝系で効果の高いβカテニン阻害剤の開発」

研究代表者 石川 俊平 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授

研究要旨

我々はin-silicoスクリーニングとしてまず、公共データベースにあるβカテニンの複数個の結晶構造および実際に合成可能な200万化合物の立体構造情報を用い、更に既知活性化合物の情報を付加することで、2種類のスクリーニングアルゴリズム両方を適用することができた。これら2つの別視点からのヒットリストの共通集合（コンセンサスヒット）を採用することで数百の第一次候補を選び最終的にはそれらから約100化合物の最終リストとした。CTNBN1-コファクターのタンパク複合体の阻害効果をin vitroで検証し、5μMの濃度で活性が見られるものについてはdose responseを検討した。その結果IC₅₀=1μM以下のものを含め母核構造の異なるヒット化合物を得た。がんゲノムシーケンシングの公共データベースを利用して、WNTシグナルの亢進する細胞株を選び出し、上記ヒット化合物の増殖阻害活性をμMレベルで確認することが出来た。最終的に細胞レベルでも活性が確認できる4個のヒット化合物を選び出して、それらの構造を用いて再び400万化合物のライブラリーから同じポケットの結合特性を持つ化合物を100個選び出した。同様の結合阻害活性で確認したところ27個の活性化合物を得ることが出来た。いくつかの化合物については腫瘍を移植した動物実験でも抗腫瘍活性を確認することが出来た。

A. 研究目的

βカテニンシグナルの異常は我が国の保健衛生上重要な位置を占める肝がんの約40%に見られ、また大腸がんの約80%以上に認められる。βカテニンシグナルの特異的阻害剤は抗腫瘍薬開発における重要な目標とされるが、これまで上市されたものはなく臨床治験まで進んだものもごく少数である。

肝がん細胞は背景肝臓細胞と同じく独特の代謝系を持ち、大腸がん細胞を含むその他の細胞とは全く違う薬剤代謝が働くと考えられ。しかしながら現在のin vitroでの化合物スクリーニングの初期過程ではこの点が全く考慮されていないため、効果的に肝がん作用する阻害剤が結果的に選ばれていない可能性が高いと考えられる。本提案では我が国で保健衛生上重要な肝がんを標的として生理的肝代謝系で効果の高いβカテニン低分子阻害剤の開発を目的とする。

抗腫瘍低分子薬の開発においては、in vitroでの活性は得られたとしても研究開発段階の後期での動物実験で望むPK/PDが得られなかったり、また肝代謝系の作用などで予期せぬ有害事象が出ることがしばしば見られる。また治験、臨床開発段階にな

って明確な奏功群を定義するバイオマーカーが得られず途中で脱落するものも見られる。しかしながら通常のHTSスクリーニングではこれらの要素を加味して行うことは困難であり、最終的なvivoでの活性・物性の最適な化合物を選ぶことが難しい。本提案では肝代謝系を持ち同時に約半数にβカテニンシグナル異常の見られる肝細胞がんをターゲットとして、上記のようなvivoでの活性・物性ゲノムバイオマーカーを指標としたin vivoスクリーニングを行い、多くのヒット化合物構造を得ることを目的とする。

βカテニンシグナルパスウェイの異常はがんにおいて最も高い頻度で見られるシグナル異常の一つである。特に我が国で保健医療上重要である肝がんでは、βカテニンの遺伝子変異が最も高頻度に見られる活性化変異（gain of function mutation）であるがこれを直接ターゲットとする分子標的薬は未だ上市されておらず肝がんは未だ難治がんの一つのままとなっている。特に我が国の肝がんはウイルス性肝硬変を伴い肝機能の低下が通常見られることから、肝不全を避けるためにも極めてがん特異的な治療薬の開発が必要と考えられる。

βカテニンシグナルをターゲットとする阻害剤の開発は多くの企業が開発経験を持っている。その大部分は欧米で比較的頻度の高い大腸がんをターゲットとし、またβカテニンシグナルパスウェイの上流であるWnt、FZDなどをターゲットとしている。そのためこれらの薬剤はシグナル最下流のβカテニン遺伝子そのものにドライバー変異の起こる肝がんには効果が低いと考えられる。現在のところβカテニンシグナルの変異というバイオマーカーと明確な相関性を持ち、肝がん効果的なシグナル阻害剤は知る限り開発されていない。

本提案で開発するβカテニン-TCF4阻害剤はβカテニンシグナルパスウェイの最下流を阻害する為、βカテニン-CBP阻害剤を初め他の多くのβカテニンシグナルパスウェイ阻害剤に対して新たな変異等により耐性を獲得したがんに対しても効果が見込めると考えられる。すなわち我が国の保健衛生上重要な大部分のがん種に対して使用可能なセカンドラインドラッグとなり得る可能性が十分に考えられる。

B. 研究方法

本提案ではヒット率を高めた比較的少数（100種程度）の化合物ライブラリーを用いて、in vitroでの活性確認後、直接肝細胞がんのマウスXenograftに投与することにより肝代謝系・生理的環境下において最も抗腫瘍活性の強い化合物を選び出すin

vivo スクリーニングを行う。この目的にはきわめてヒット率の高いライブラリーを用いる必要があるが、我々は既知の複数化合物の構造をもとに、スーパーコンピューターを用いたin silico drug スクリーニングの手法を用いて約200万化合物のなかから極めてヒット率の高いと予想されるの100個程度の化合物候補をすでに選び出した。また肝がん細胞株のカテニンシグナル異常の有無をゲノム情報を用いて同定しスクリーニングを行う。これらの細胞株を用いたスクリーニングによりβカテニンシグナル異常という明確なゲノムバイオマーカーに相関する特異性の高い化合物を選び出す。このような化合物は同時に正常細胞の相対的感受性が低い（治療ウィンドウの広い）薬物候補と考えられる。初年度はゲノム情報を用いて肝がん細胞株パネルのカテニンシグナル異常の有無を決定し、スーパーコンピューターを用いて選択している化合物のin-vitro, in-vivoでの活性化化合物を得る。2年度目は活性化化合物の構造から更に類似構造を探索してスクリーニングを行いより多くのヒット化合物構造の同定、最適化を行う予定である。従来の創薬スクリーニング手法と異なるところは、初期段階からゲノムバイオマーカーを明確に定義してin vivoの肝代謝系でスクリーニングを行う点である。そのため既知活性化化合物の構造を取り入れた大規模な構造計算によってヒット率を格段に高めた少数のライブラリーを選択している。こうした独自のスクリーニングを行うことにより、最終的には我が国を初めアジアで重要な位置を占める肝がんにおけるbest-in-classのカテニンシグナル阻害剤の開発を目指す。

我々はβカテニンとTCF4との結合を阻害することが確認されている既知の複数化合物の構造をもとに、スーパーコンピューターを用いたin silico drug スクリーニングの手法を用いて約200万化合物のなかから極めてヒット率の高いと予想される大半が新規化合物骨格を持つ100個程度の化合物候補をすでに選び出している。

本研究の特色として肝代謝系を持つ肝細胞がんにおいて生理的条件下で最も効果の高い化合物の探索を目的としてin vivoの状態でのスクリーニングを行うことや既知の活性化化合物の分子構造を複数取り入れることにより、200万化合物からのin silico スクリーニングの精度を格段に高めていること、さらにはカテニンシグナル異常という明確なゲノムバイオマーカーを定義してスクリーニングを行うことがあげられる。この過程は通常企業が行うHTSによってin vitro スクリーニングから始まる過程とは異なり、通常は開発後期で問題になるin vivoでのPK/PD、肝代謝、バイオマーカーといった項目を初期段階のスクリーニングに用いている。本スクリーニング法は通常のHTSのように数万種の化合物を扱うことは困難であり、よりヒット率の高い化合物ライブラリーの選択が求められる。この計画ではスーパーコンピューターを使った200万種類のドッキングシュミレーションに、既知活性化化合物の構造を取り込むことによりヒット率のきわめて高いライブラリーを選択している。

（倫理面への配慮）当該法律並びに関係省庁からの通達などにしたがって東京医科歯科大学が定める、「東京医科歯科大学動物実験規則」に準じて行う。すなわち、適正な飼育環境及び管理のもとに苦痛や恐怖を伴わない取り扱いを行う。さらに、安全管理

には十分な配慮を払う。動物実験は、東京医科歯科大学動物実験委員会に実験申請を行い、承認を受けて実施している

C. 研究結果

in-silicoスクリーニングとして公共データベースにあるβカテニンの結晶構造および実際に合成可能な200万化合物の立体構造情報を用い、スコアを得た。このスコアに対して更に既知活性化化合物の情報を付加することで、2種類のスクリーニングアルゴリズムの両方を適用することができた。既知化合物情報を利用した機械学習によりスクリーニング精度を高めたことに加え、2つの別視点からのヒットリストの共通集合（コンセンサスヒット）を採用することで、ライブラリーにおけるヒット率を飛躍的に向上させることができる。このようにして有望な化合物を数百に絞った上で、最終的に約100化合物の最終リストとした。この最終リスト化合物は、約半数が既知活性化化合物を超えた高活性領域への分布を示し、既存の阻害剤を上回る活性を有する新規骨格の獲得の可能性が考えられた。カテニン-コファクターの結合阻害を測定するスクリーニング系を構築してこれらの化合物の結合阻害活性を測定し、5μMの濃度で活性が見られるものについては、dose responseを検討した。その結果IC₅₀=1μM以下のものを含め母核構造の異なる複数個のヒット化合物を得た。スクリーニングに用いるWNTシグナルの活性化している細胞株の選定においては、肝がん全体のゲノムプロファイルをTCGA (The Cancer Genome Atlas Project) データベース及びCCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) データベースを参照しながら、最終的にカテニン等主要な遺伝子のシーケンスを行うことによって確認した。これらの細胞株について、薬剤添加時の経時的な細胞増殖の変化を測定してIC₅₀濃度を測定した。その結果4個の化合物については、明らかな増殖阻害活性を認め、細胞株によって多少感受性の特性が異なるもののμMオーダーの感受性を示す細胞株と化合物の組み合わせも見られた。これらの4種の活性化化合物の構造及び、最初に用いた既知化合物の構造を用いて同じポケット結合特性を持つ化合物を400万化合物より機械学習により選び出し、さらには他のアルゴリズムの相対的評価も参考にしながら最終的に約100種の化合物を選び出した。一度目のin silicoスクリーニングの結果と併せて計206個の化合物を再びカテニン-コファクターの結合阻害を測定したところ5μMにおいて、既知化合物よりも活性の強い化合物を27個同定することが可能であった。In vivoの状態での抗腫瘍活性を確認すべく、カテニンシグナル陽性の肝がん細胞株をマウスに移植したxenograftの系で腹腔内投与を行った。その結果10mg/Kgの週3回投与において既知化合物よりも強い抗腫瘍効果を認めた。マウスは2週間の投与の間は1割程度の体重減少を認めたが、下痢などのある程度予想される副作用の所見は認められなかった。

D. 考察

1ラウンド目ヒット化合物選定においては活性化化合物構造を多く得るために、in-silicoスクリーニング及びin vitroでの結合阻害活性、及び細胞レベルの増殖阻害活性による簡便な絞り込みにとどめ4個の活性化化合物を残した。これらの化合物を用いた

2ndラウンドのin-silicoスクリーニングでは、27個というより多くのヒット化合物を得ることが出来機械学習がうまく機能していると考えられる。これら多くの母骨格構造を持つ化合物を持ちいて、カテニンシグナル陰性細胞株との効果のwindowを正確に定量するなど、より精度の高い評価法が必要と考えられる。In vivo スクリーニングで抗腫瘍活性が見られた化合物については、物性評価、薬理効果、毒性評価、薬物動態評価（マウス）の確認を予定している。またこうして絞り込んだ化合物の類似化合物を体系的に評価することによってQSAR（構造活性相関）の同定も今後必要になる。

E. 結論

我々はin-silicoスクリーニングとしてまず、公共データベースにあるβカテニンの結晶構造および実際に合成可能な200万化合物の立体構造情報を用い、更に既知活性化合物の情報を付加することで、2種類のスクリーニングアルゴリズム両方を適用することができた。これら2つの別視点からのヒットリストの共通集合（コンセンサスヒット）を採用することで数百の第一次候補を選び最終的にはそれらから約100化合物の最終リストとした。5 uMの濃度で活性が見られるものについては、dose responseを検討した。その結果IC50=1μM以下のものを含め母核構造の異なるヒット化合物を得た。細胞レベルの検討ではカテニンシグナル活性化細胞株に対してIC50がuMレベルでの化合物を見いだすことが出来た。これらの化合物構造をもとに2ndラウンドのin-silicoスクリーニングを行い。今度は400万化合物のなかから27個の活性化合物を売ることが出来た。これらの化合物のいくつかについてはマウスのXenograftモデルを用いた系でも抗腫瘍効果を観測することができた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13) Moscow, Russia
July 25–28, 2013

Ryohei Suzuki, Daisuke Komura, Kazuki Yamamoto, Shumpei Ishikawa

「Restraint-based 3D Shape Manipulation Method using Hand Gestures for Interactive Molecular Dynamics」

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

化合物の重要なコンセンサスの骨格が得られた時点で、周辺化合物を含めての知的財産権の出願を予定している。

別添4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 該当なし

雑誌 該当なし

