

京都大学	博士（薬学）	氏名	酒井 麻利奈
論文題目	ピラゾール骨格を有する新規低酸素誘導因子HIF-1阻害剤の開発研究		
<p>(論文の要旨)</p> <p>がんは死因の第一位を占め、日本人の2人に1人が生涯のうちにがんを罹患する。低酸素誘導因子Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) は、がん細胞の特徴の1つである低酸素応答を担う。転写因子HIF-1は、HIF-1αとHIF-1βの2つのサブユニットからなり、恒常的に発現しているHIF-1βに対して、HIF-1αは酸素依存的に分解される。腫瘍組織内の低酸素領域では、HIF-1は蓄積・活性化され、一般的にIL-6受容体経路、mTOR経路、MAPキナーゼ経路とクロストークしつつ、がん悪性化に寄与している。しかし、がん悪性化に関与するHIF-1の分子間ネットワークは未解明な部分が多い。一方、HIF-1阻害剤は抗がん剤の創薬ターゲットとして注目を集めており、優れたHIF-1阻害剤を開発できれば、その分子機構を明らかにするための分子ツールとして有用であるだけでなく、新規な抗がん剤の創製へとつながることが期待される。そこで本研究では、新たに見出したピラゾール骨格を有するHIF-1阻害剤の構造活性相関研究及び作用機序解析研究を行った。</p> <p>第一章 ピラゾール骨格を有するHIF-1阻害剤KUSC-5001類の構造活性相関</p> <p>HIF-1の転写活性を検出可能なHeLa/5HRE-Luc細胞を用いたHIF-1活性評価系を活用したスクリーニング研究の結果、ヒット化合物としてピラゾール骨格を有するKUSC-5001を得た。KUSC-5001は既知化合物であったが、HeLa/5HRE-Luc細胞に対して中程度のHIF-1阻害活性を示した(IC₅₀=18μM)。本化合物の化学構造的な特性はメディシナルケミストリー的展開に適していると判断し、化合物を3つのフラグメント（左（領域1）、中央（領域3）、右（領域2））に分けて構造活性相関を展開した。合成した誘導体は各種クロマトグラフィーによる精製を行い、¹H-NMR、¹³C-NMRと各種二次元NMR及び高分解能質量分析(HR-ESI-MS)により化学構造を決定した。左フラグメント（領域1）における芳香環上の置換基の変換には、経験則として知られるTopliss Treeを用いた。その結果、KUSC-5001の置換位置が最も適切であることが明らかになった。中央フラグメントの変換（領域3）では、ピラゾール環をフラン環やベンゼン環に変換することを試みたが、活性の向上には至らなかった。続いて、右フラグメント（領域2）の変換に着手した。ピラゾール上のニトロ基部分に着目し、官能基変換を試みたところ、アミンでは活性が保持され、アシル鎖の導入で活性が向上した。Topliss Treeを用いた経験則に従い、アシル鎖部分のアルキル鎖の長さの検討を行い、エチル基への変換で活性が向上した。しかし、その後の各種分子プローブの設計・創製を指向してさらなる構造許容性を評価した。ベンジル基の導入でも活性が保持できたことから、各種分子プローブ化が可能であると考えた。また、アミド部分の極性にに基づき、アルキルアミンやスルホンアミド基への変換を行ったが、いずれの場合も活性が保持されたことから、脂溶性と水溶性のバランスが本化合物群に関して活性発現に重要であると考察した。総じて、約50種類の誘導体の合成とHIF-1阻害活性の評価を行った。その結果、力価が向上した新規HIF-1阻害剤KUSC-5037の設計・創製に成功するとともに(IC₅₀=1.2μM)、分子内の構造許容性部位を見出し、第二章で用いる各種分子プローブの設計に有益な知見を得た。</p> <p>第二章 新規HIF-1阻害剤KUSC-5037類の作用機序解析</p> <p>新規HIF-1阻害剤KUSC-5037は、低濃度条件（1% O₂）で誘導されるHIF-1の転写活性を阻害するとともに、HIF-1αタンパク質の蓄積を阻害した。そこで、KUSC-5037の化学構造に着目し、STAT3阻害剤5, 15-DPPと類似の構造を持つことから、KUSC-5037がSTAT3阻害活性を持つと推定し検証を行った。その結果、KUSC-5037はHeLa/5HRE-Luc細胞においてインターフェロンα刺激により、濃度依存的にSTAT3の705番目のチロシン残基のリン酸化阻害活性を示した(0.3-3μM)。STAT3は、抗がん剤創薬ターゲットとして注目を集めており、IL-6受容体経路を通じてHIF-1活性を調節する。一方、KUSC-5037は、Aktのリン酸化を阻害しないことから</p>			

mTOR経路への影響は低いことが示唆された。そこで、標的タンパク質、作用機構の類推を目的として、化合物の化学構造類似性に着目した。その結果、KUSC-5037は電子伝達系複合体 I の阻害剤IACS-010759と類似した2次元化学構造類似性を持つことを見出した。しかし、両者の3次元化学構造類似性を分子動学的計算 (MM2) により評価したところ、異なる最安定配座をとった。そこで、両者は異なる活性を持つ可能性が示唆され、その検証を目的として細胞外フラックスアナライザーを用いて、KUSC-5037がミトコンドリアの機能に及ぼす影響を評価した。その結果、KUSC-5037は電子伝達系複合体 I の阻害剤とは異なる作用で電子伝達系を阻害した。XFミトストレステストによる評価からKUSC-5037は電子伝達系を阻害する可能性が示唆された。また、KUSC-5037は細胞系列依存的にがん細胞の増殖を抑制した。

続いて、KUSC-5037の標的タンパク質の探索・同定研究を行った。KUSC-5037の構造許容性部位に着目して、蛍光団BODIPY基を導入した蛍光分子プローブKUSC-5054を設計・合成し化合物の可視化を行った。KUSC-5054はHeLa/5HRE-Luc細胞を用いた活性評価において、KUSC-5037とほぼ同程度のHIF-1阻害活性を示した。そこで、KUSC-5054を用いて細胞内局在を検討した結果、ミトコンドリアへの優位な存在が示唆された。次に、光親和性基と、アルキンタグを導入した二機能性分子プローブKUSC-5051を設計・合成して、結合タンパク質のプルダウン実験を行った。光親和性基は、紫外光(365nm)を照射することで標的タンパク質と共有結合を形成する。また、アルキンタグを足がかりとしたクリック反応によりビオチンタグを導入することで、ビオチン-ニュートラアビジンシステムを用いた結合タンパク質のプルダウンを行うことができる。細胞抽出液の各種画分に分子プローブKUSC-5051を添加し、Affinity-based protein profiling (AfBPP)法を用いて各種検討を行った。その結果、主としてミトコンドリア画分を用いた検討において、結合タンパク質Xの検出に成功した。続いて、結合タンパク質Xに対するKUSC-5037の効果を検討した結果、KUSC-5037は結合タンパク質Xの酵素機能を阻害した。

第三章総括

本研究では、がん悪性化を促進するHIF-1に対する阻害活性を有するピラゾール骨格を有する化合物群の構造活性相関研究を行った結果、新規HIF-1阻害剤KUSC-5037類の開発に成功した。KUSC-5037は、細胞系列依存的にがん細胞の増殖を抑制し、抗がん剤リード化合物として有用であることが示唆された。さらに、生化学的解析とケミカルバイオロジー的手法から結合タンパク質Xの同定に至った。標的タンパク質XとHIF-1との直接的な関係性は未解明であるが、今後の研究でHIF-1が関与する新たな分子間ネットワークが明らかとなることが期待される。また、KUSC-5037の標的タンパク質Xとの複合体形成様式や結合部位が解明されれば、より論理的にKUSC-5037の構造最適化研究が可能になり、新規分子標的抗がん剤開発への貢献が期待される。

※ 学位授与された方の「論文内容の要旨」、「論文審査結果の要旨」（審査教員作成）は、学位授与日から3ヶ月以内に京都大学学術情報リポジトリに掲載され公開されます。学位申請を行う方は掲載を承認されたものとします。

(論文審査の結果の要旨)

がんは死因の第一位を占め、日本人の2人に1人が生涯のうちにがんを罹患する。低酸素誘導因子Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) は、がん細胞の特徴の1つである低酸素応答を担う。転写因子HIF-1は、HIF-1 α とHIF-1 β の2つのサブユニットからなり、恒常的に発現しているHIF-1 β に対して、HIF-1 α は酸素依存的に分解される。腫瘍組織内の低酸素領域では、HIF-1は蓄積・活性化され、一般的にIL-6受容体経路、mTOR経路、MAPキナーゼ経路とクロストークしつつ、がん悪性化に寄与している。しかし、がん悪性化に関与するHIF-1の分子間ネットワークは未解明な部分が多い。一方、HIF-1阻害剤は抗がん剤の創薬ターゲットとして注目を集めており、優れたHIF-1阻害剤を開発できれば、その分子機構を明らかにするための分子ツールとして有用であるだけでなく、新規な抗がん剤の創製へとつながることが期待される。そこで著者は、本研究において、新たに見出したピラゾール骨格を有するHIF-1阻害剤の構造活性相関研究及び作用機序解析研究を行った。

著者は、はじめに、ピラゾール骨格を有するHIF-1阻害剤KUSC-5001類の詳細な構造活性相関研究を行った。すなわち、HIF-1の転写活性を検出可能なHeLa/5HRE-Luc細胞を用いたHIF-1活性評価系を活用したスクリーニング研究の結果、ヒット化合物としてピラゾール骨格を有するKUSC-5001(IC₅₀=18 μ M)を取得した。本化合物の化学構造的な特性はメディシナルケミストリーの展開に適していると判断し、化合物を3つのフラグメント(左(領域1)、中央(領域3)、右(領域2))に分けて構造活性相関を展開した。合成した誘導体は各種クロマトグラフィーによる精製を行い、¹H-NMR、¹³C-NMRと各種二次元NMR及び高分解能質量分析(HR-ESI-MS)により化学構造を決定した。左フラグメント(領域1)における芳香環上の置換基の変換には、経験則として知られるTopliss Treeを用いた。その結果、KUSC-5001の置換位置が最も適切であることが明らかになった。中央フラグメントの変換(領域3)では、ピラゾール環をフラン環やベンゼン環に変換することを試みたが、活性の向上には至らなかった。続いて、右フラグメント(領域2)の変換を行った。特に、ピラゾール上のニトロ基部分に着目し、官能基変換を試みたところ、アミンでは活性が保持され、アシル鎖の導入で活性が向上した。Topliss Treeを用いた経験則に従い、アシル鎖部分のアルキル鎖の長さの検討を行い、エチル基への変換で活性が向上した。しかし、その後の各種分子プローブの設計・創製を指向してさらなる構造許容性を評価した。ベンジル基の導入でも活性が保持できたことから、各種分子プローブ化が可能であると考えた。また、アミド部分の極性にに基づき、アルキルアミンやスルホンアミド基への変換を行ったが、いずれの場合も活性が保持されたことから、脂溶性と水溶性のバランスが本化合物群に関して活性発現に重要であると考察した。総じて、約50種類の誘導体の合成とHIF-1阻害活性の評価を行った結果、力価が向上した新規HIF-1阻害剤KUSC-5037の設計・創製に成功するとともに(IC₅₀=1.2 μ M)、分子内の構造許容性部位を見出し、第二章で用いる各種分子プローブの設計に有益な知見を得た。

続いて、著者は、新規HIF-1阻害剤KUSC-5037類の詳細な作用機序解析研究を行った。新規HIF-1阻害剤KUSC-5037は、低濃度条件(1% O₂)で誘導されるHIF-1の転写活性を阻害するとともに、HIF-1 α タンパク質の蓄積を阻害した。そこで、KUSC-5037の化学構造に着目し、STAT3阻害剤5, 15-DPPと類似の構造を持つことから、KUSC-5037がSTAT3阻害活性を持つと推定し検証を行った。その結果、KUSC-5037はHeLa/5HRE-Luc細胞においてインターフェロン α 刺激により、濃度依存的にSTAT3の705番目のチロシン残基のリン酸化阻害活性を示した(0.3-3 μ M)。STAT3は、抗がん剤創薬ターゲットとして注目を集めており、IL-6受容体経路を通じてHIF-1活性を調節する。一方、KUSC-5037は、Aktのリン酸化を阻害しないことからmTOR経路への影響は低いことが示唆された。そこで、標的タンパク質、作用機構の類推を目的として、化合物の化学構造類似性に着目した。その結果、KUSC-5037は電子伝達系複合体Iの阻害剤IACS-010759と類似した2次元的化学構造類似性を持つことを見出した。しかし、両者の3次元的化学構造類似性を分子動力的計算(MM2)により評価したところ、異なる最安定配座をとった。そこで、両者は異なる活性を持つ可能性が示唆され、その検証を目的として細胞外フラックスアナライザーを用いて、KUSC-5037がミトコンドリアの機能に及ぼす影響を評価した。その結果、KUSC-5037は電子伝達系複合体Iの阻害剤とは異なる作用で電子伝達系を阻害した。XFミトストレステストによる評価からKUSC-5037は電子伝達系を阻害する可能

性が示唆された。また、KUSC-5037は細胞系列依存的にがん細胞の増殖を抑制した。

続いて、KUSC-5037の標的タンパク質の探索・同定研究を行った。KUSC-5037の構造許容性部位に着目して、蛍光団BODIPY基を導入した蛍光分子プローブKUSC-5054を設計・合成し化合物の可視化を行った。KUSC-5054はHeLa/5HRE-Luc細胞を用いた活性評価において、KUSC-5037とほぼ同程度のHIF-1阻害活性を示した。そこで、KUSC-5054を用いて細胞内局在を検討した結果、ミトコンドリアへの優位な存在が示唆された。次に、光親和性基と、アルキルタグを導入した二機能性分子プローブKUSC-5051を設計・合成して、結合タンパク質のプルダウン実験を行った。細胞抽出液の各種画分に分子プローブKUSC-5051を添加し、Affinity-based protein profiling (AfBPP)法を用いて各種検討を行った。その結果、主としてミトコンドリア画分を用いた検討において、結合タンパク質Xの検出に成功した。続いて、結合タンパク質Xに対するKUSC-5037の効果を検討した結果、KUSC-5037は結合タンパク質Xの酵素機能を阻害した。

以上のように、著者は、本研究において、がん悪性化を促進するHIF-1に対する阻害活性を有するピラゾール骨格を有する化合物群の詳細な構造活性相関研究を行った結果、新規HIF-1阻害剤KUSC-5037類の開発に成功した。KUSC-5037は、細胞系列依存的にがん細胞の増殖を抑制し、抗がん剤リード化合物として有用であることが示唆された。さらに、生化学的解析とケミカルバイオロジー的手法から結合タンパク質Xの同定に至った。標的タンパク質XとHIF-1との直接的な関係性は未解明であるが、今後の研究でHIF-1が関与する新たな分子間ネットワークが明らかとなることが期待される。また、KUSC-5037の標的タンパク質Xとの複合体形成様式や結合部位が解明されれば、より論理的にKUSC-5037の構造最適化研究が可能になり、新規分子標的抗がん剤開発への貢献が期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：4年 6月 23日以降