

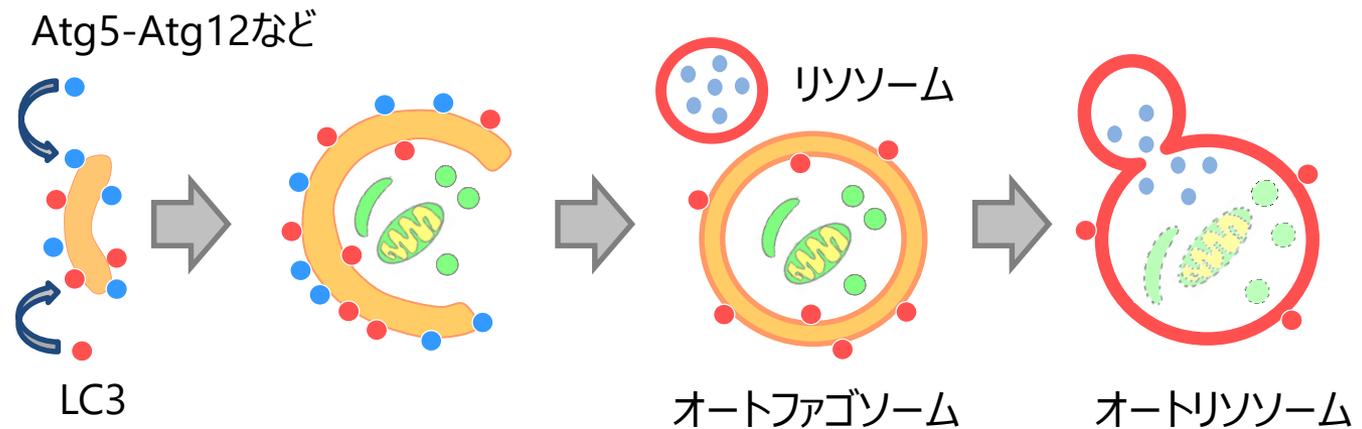
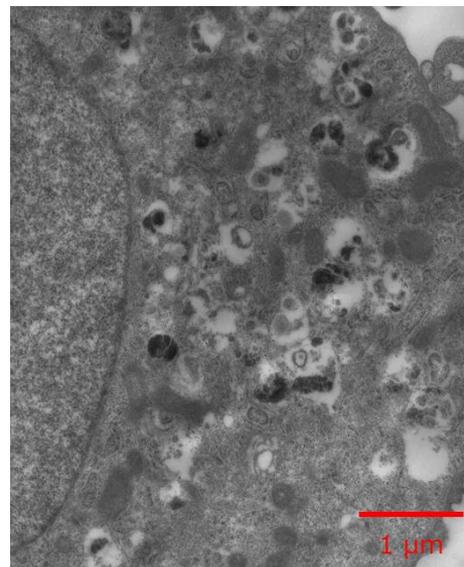
がんアジュバント薬を指向した オートファジー阻害剤の開発

岐阜薬科大学
生命薬学大講座 生化学研究室
准教授 遠藤 智史

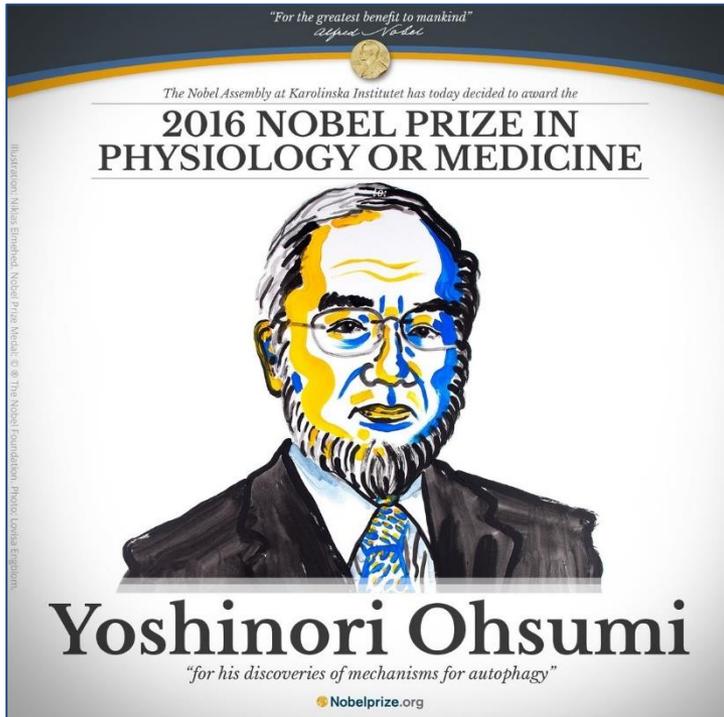
細胞の恒常性を維持するために、細胞質成分をリソソームで適切に分解するための主要分解機構

- 栄養飢餓時の栄養素の獲得
- 細胞内不要物 (病原微生物や異常タンパク質) の除去

【TBE-induced autophagy in A549 cells】



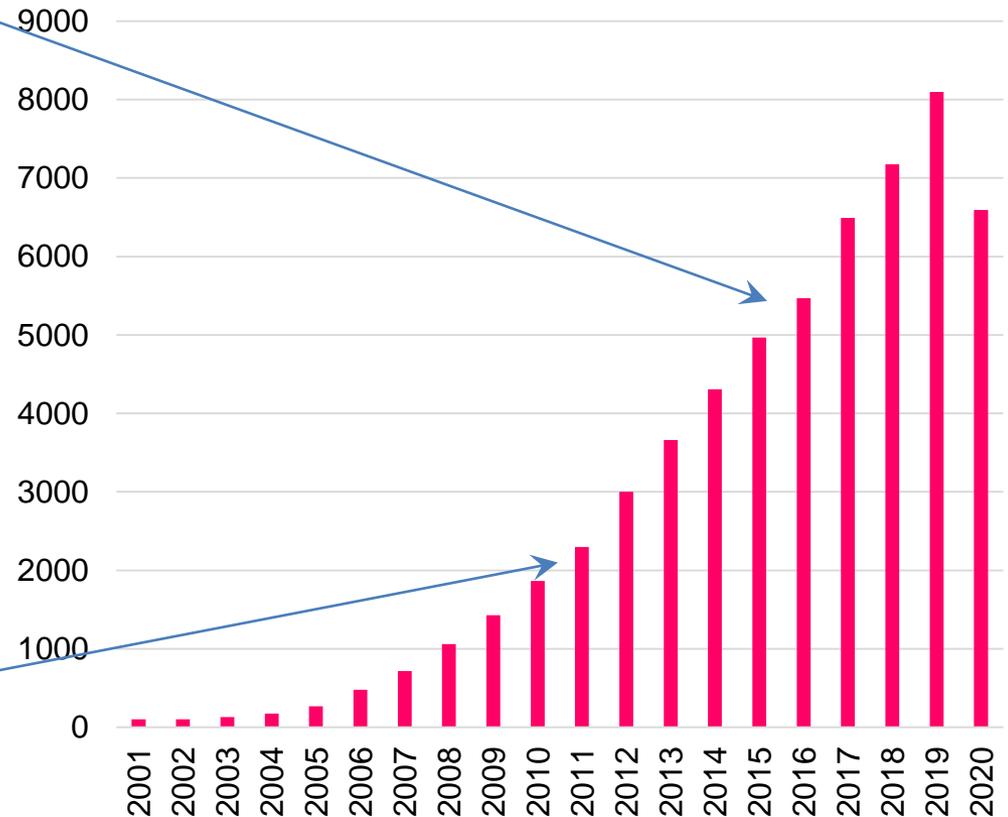
Endo et al., *Chem. Biol. Interact.*,
234, 282-289 (2015)



www.nobelprize.org/

マウスのがんをオートファジーで抑制
できることを実証
*Takemura et al., Gene Dev., 25, 795-
800 (2011)*

2017年にはオートファジー関連
論文は年間5000件を突破した。

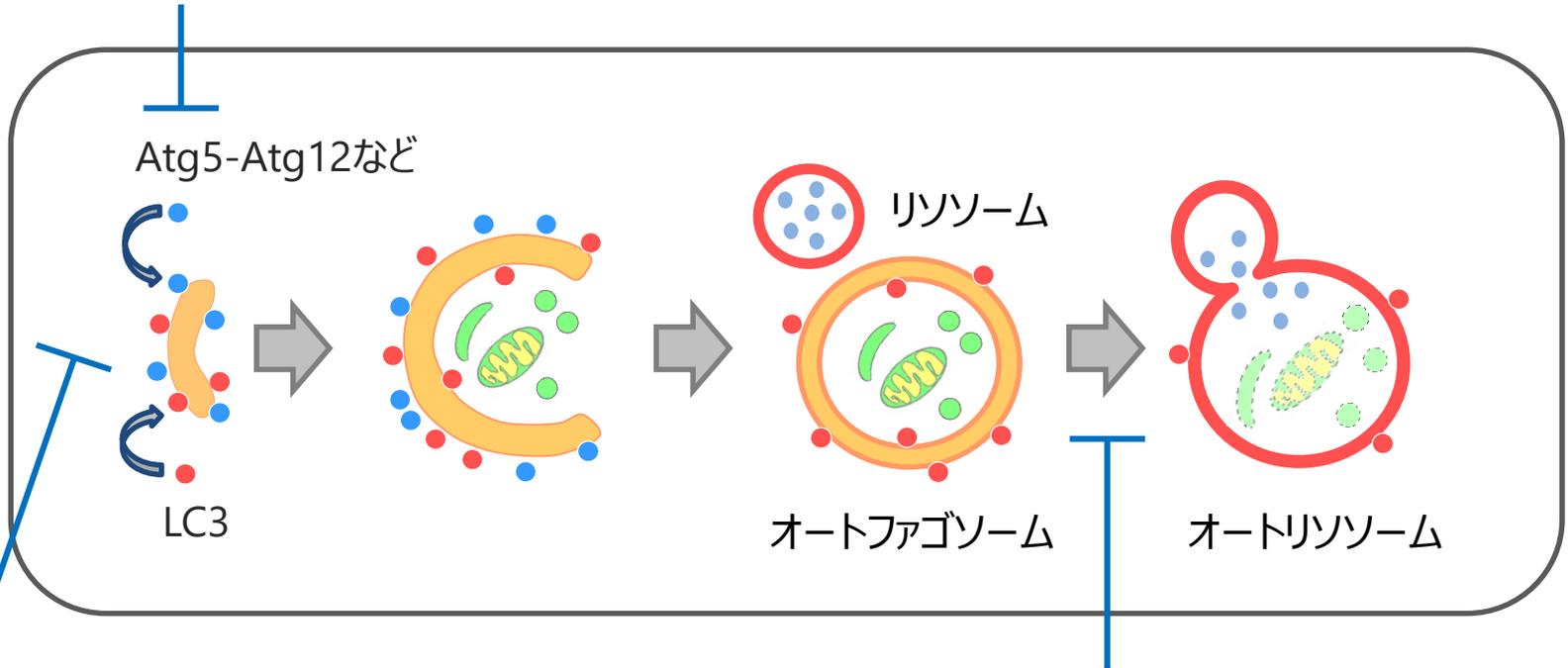


[Gene regulation]

Atg5 KO/KD

Atg7 KO/KD

Atg4B dominant-negative mutation (Atg4B C74A)



[PI3 kinase inhibitors]

3-Methyladenine

Wortmannin

LY294002

オートファジー
特異的ではない

[Lysosomal inhibitors]

Hydroxychloroquine

Chloroquine

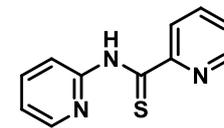
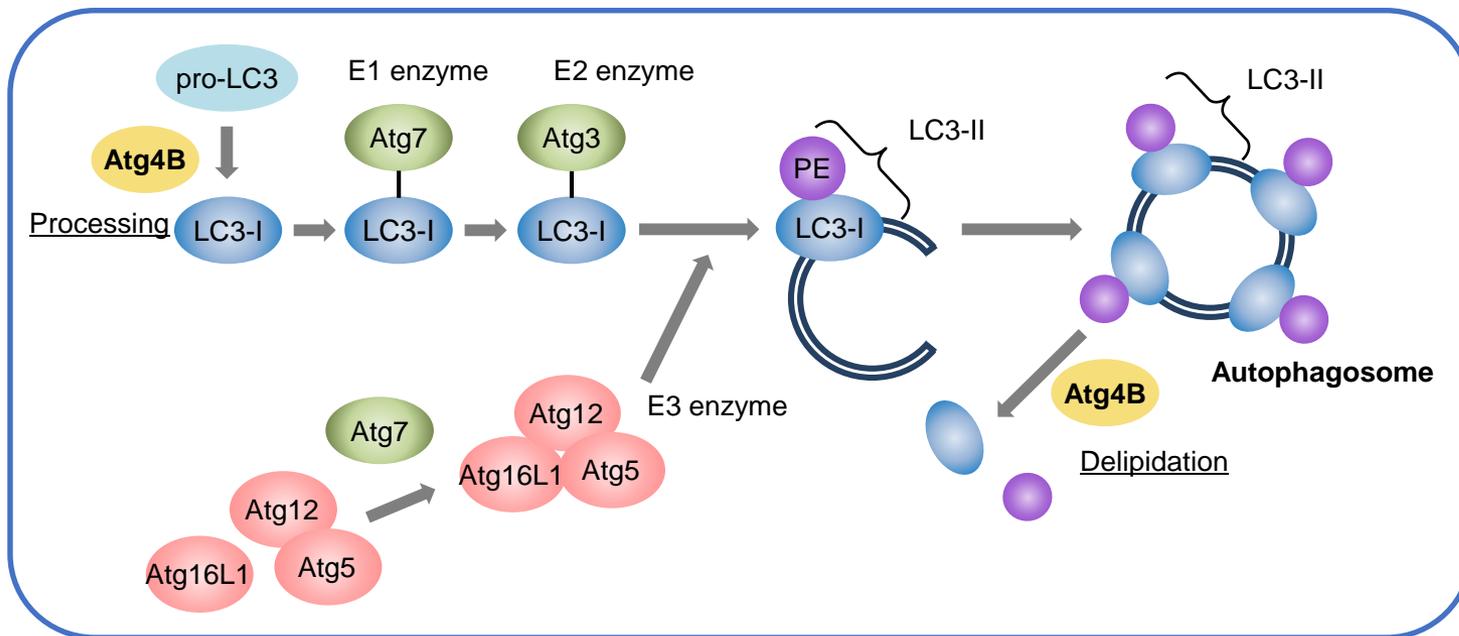
Bafilomycin A1

Treatment	Condition	Phase	Trial Reference at ClinicalTrials.gov
HCQ + sunitinib malate	Adult solid neoplasm	I	NCT00813423
HCQ + vorinostat	Malignant solid tumor	I	NCT01023737
HCQ + sirolimus or vorinostat	Advanced cancers	I	NCT01266057
HCQ + Akt inhibitor MK-2206	Advanced cancers	I	NCT01480154
HCQ as a single agent	ER-positive breast cancer	I	NCT02414776
HCQ + gemcitabine	Advanced adenocarcinoma	I/II	NCT01506973
HCQ + Interleukin 2	Renal cell carcinoma	I/II	NCT01550367
HCQ + vorinostat	Colorectal cancer	I/II	NCT02316340
HCQ + gemcitabine/carboplatin	Small cell lung cancer	I/II	NCT02722369
HCQ + capecitabine	Pancreatic carcinoma	II	NCT01494155
HCQ as a single agent	Prostate cancer	II	NCT00726596
HCQ + Abraxane/gemcitabine	Pancreatic carcinoma	II	NCT01978184

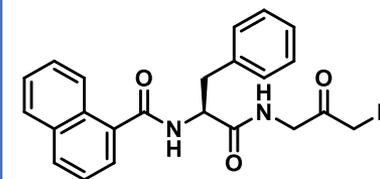
Chude et al., Int. J. Mol. Sci., 18, 1279 (2017)

- ヒドロキシクロロキン (HCQ) 1200 mg/日で上記のいくつかの抗がん剤との併用で有意な抗腫瘍活性を示した
- HCQ 800 mg/日の投与でグレード3~4の好中球減少症や血小板減少症の副作用が頻発
- HCQ 600 mg/日以下では、悪性神経膠腫の患者の全生存率を有意に改善せず
- 高容量または長期間の投与で、深刻な網膜症の発症リスクの増大

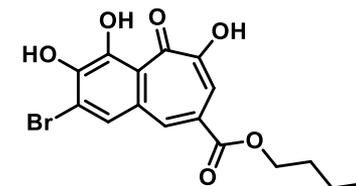
⇒ ヒドロキシクロロキン (リソソーム阻害剤) を用いたがん治療には高い壁がある



NSC185058

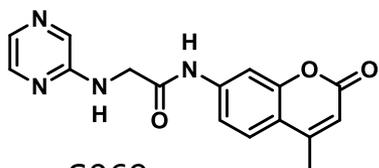


FMK9a

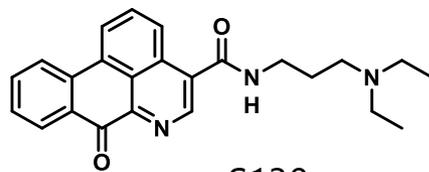


UAMC-2526

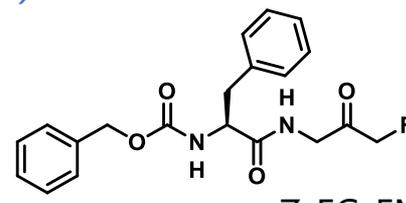
- Atg4B C74S変異体の導入は不完全なオートファゴソーム膜の形成を導く
Fujita et al., Mol. Biol. Cell, 19, 4651-4659 (2008)
- Atg4B阻害剤NSC185058は骨肉腫細胞に対して抗癌活性を示す
Akin et al., Autophagy, 10, 2021-2035 (2014)
- Atg4B阻害剤はシスプラチン耐性肺がん細胞のシスプラチン感受性を改善する
Endo et al., Comput. Toxicol., 12, 100095 (2019)



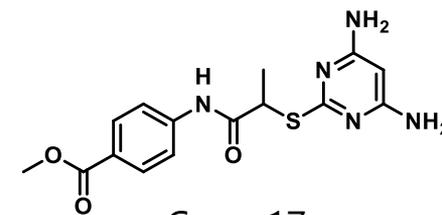
S069



S130



Z-FG-FMK



Comp17

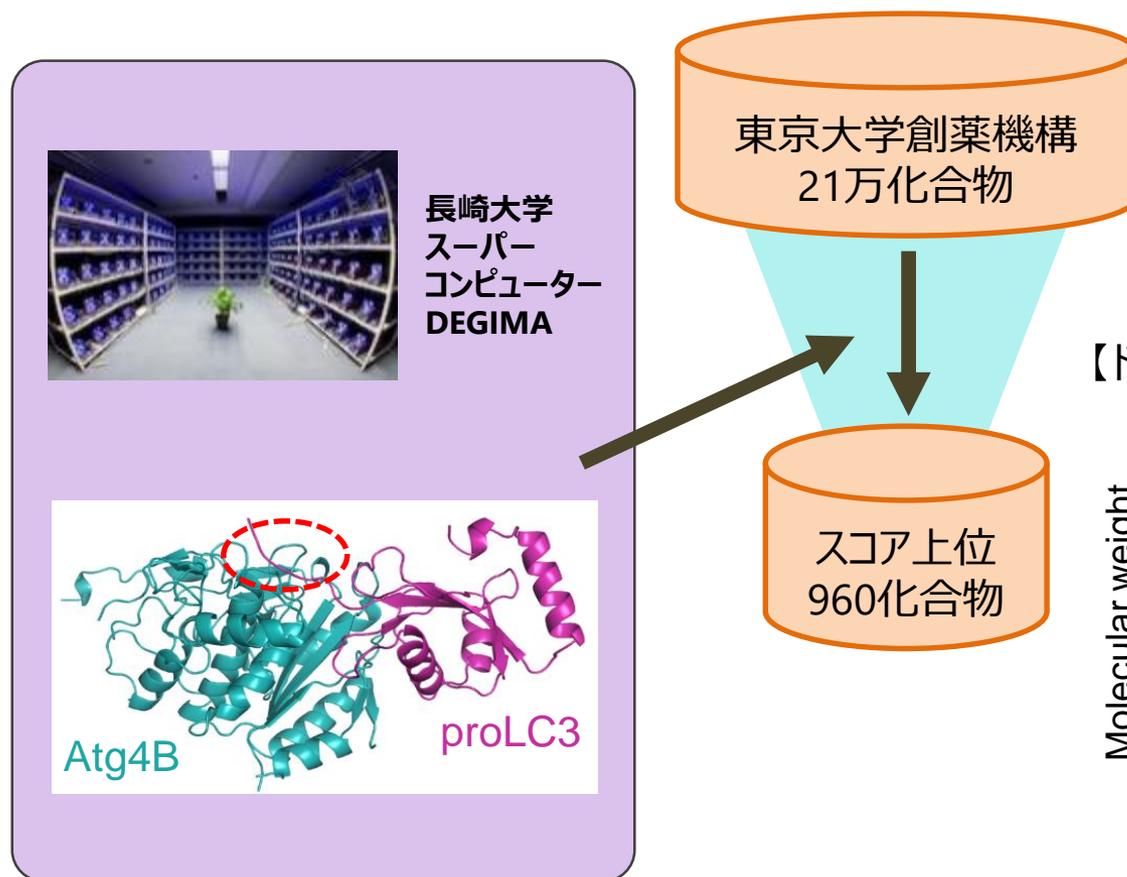
【内容】

1. Atg4B阻害活性を有するリード化合物の探索
2. 立体構造に基づく構造最適化による強力なAtg4B阻害剤の創製

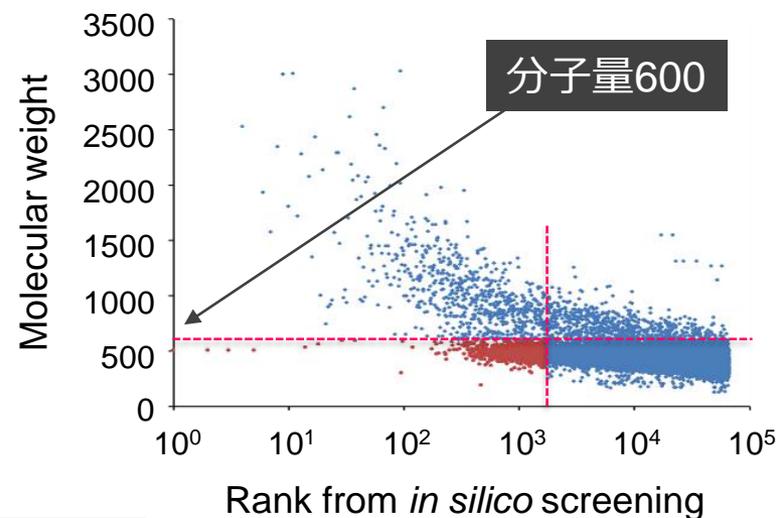
【内容】

1. Atg4B阻害活性を有するリード化合物の探索
2. 立体構造に基づく構造最適化による強力なAtg4B阻害剤の創製

① *in silico*スクリーニングによる候補化合物の探索

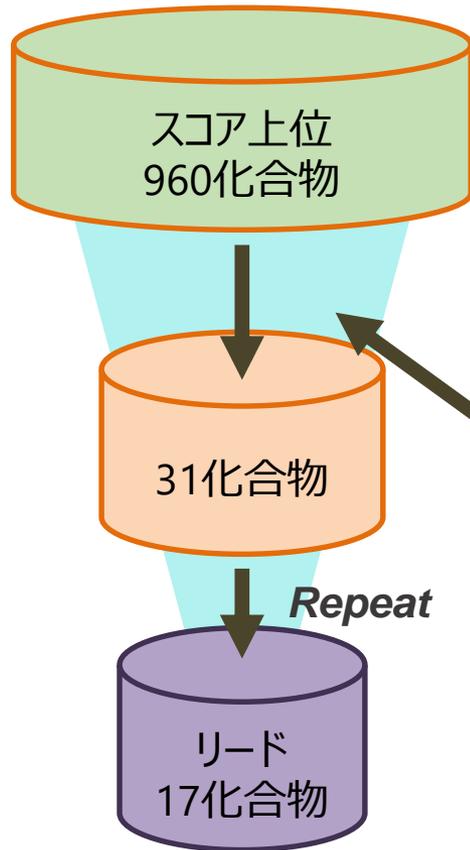


【ドッキング順位と分子量の関係】

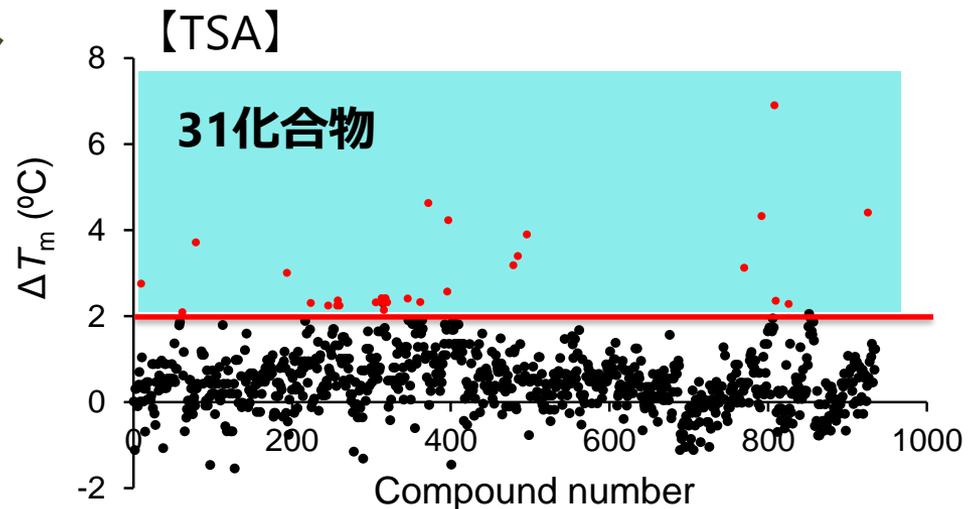
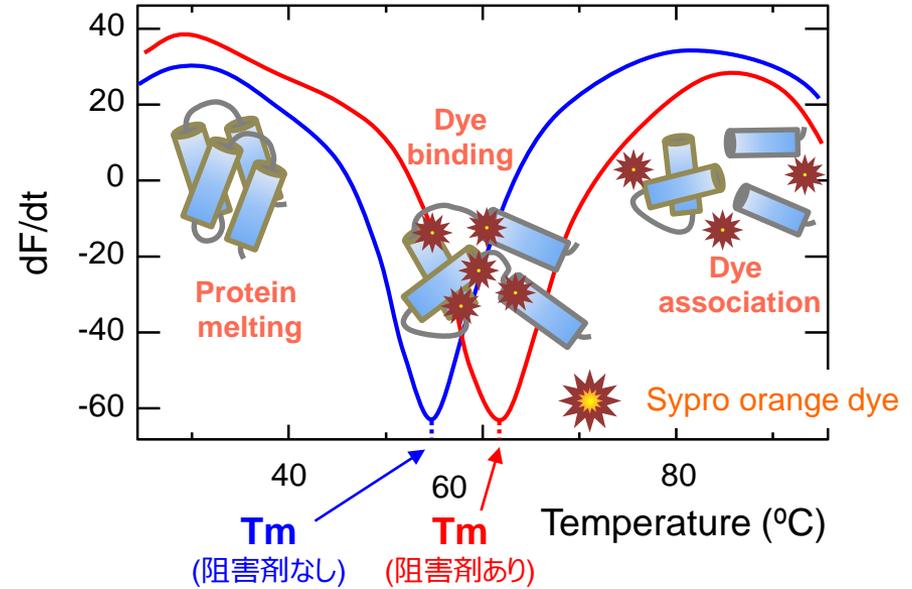


結合エネルギーから得られたドッキングスコアの上位ランク化合物の中から、分子量600以下の960化合物を選択した。

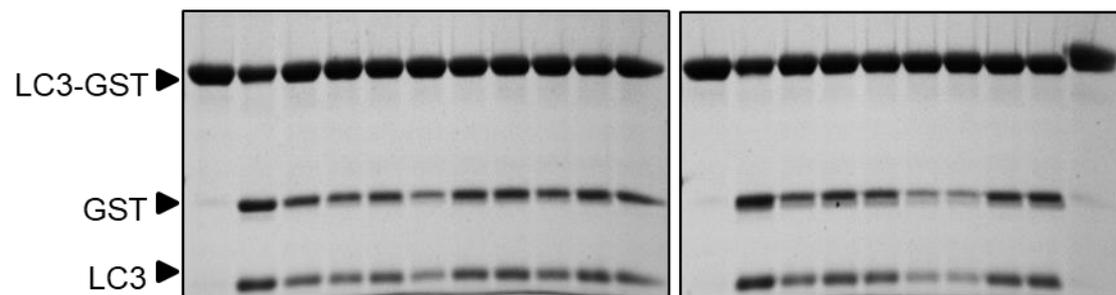
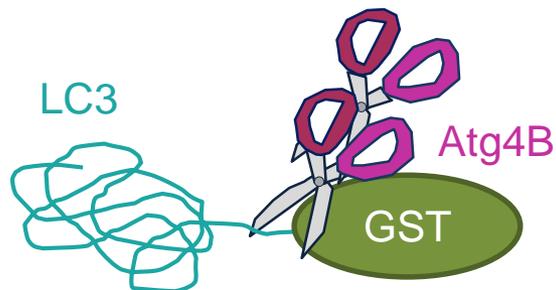
② Thermal shift assay (TSA) によるリガンド候補化合物の同定



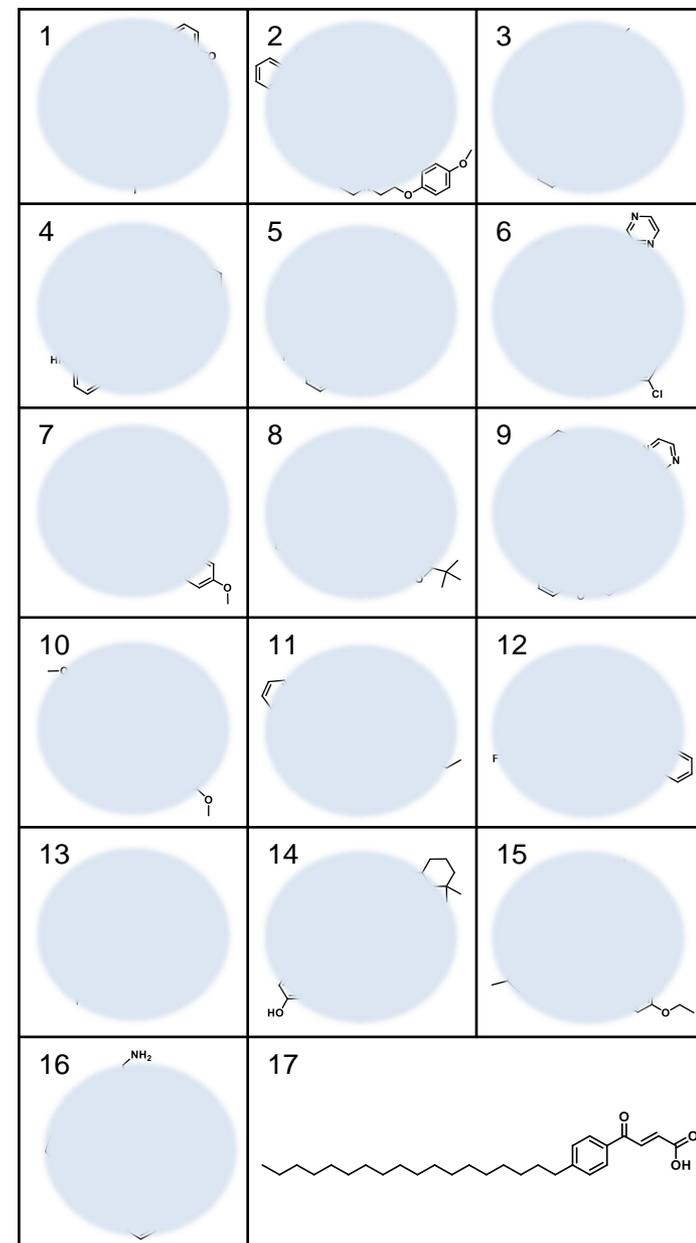
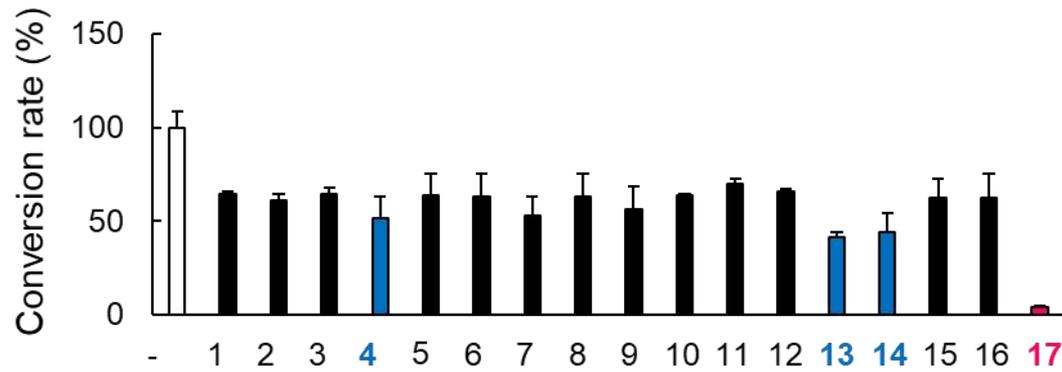
TSAを繰り返し、リードとなる
17化合物を選択した。



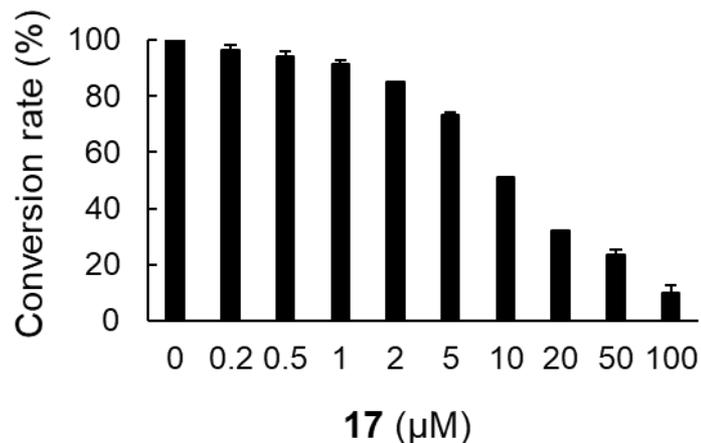
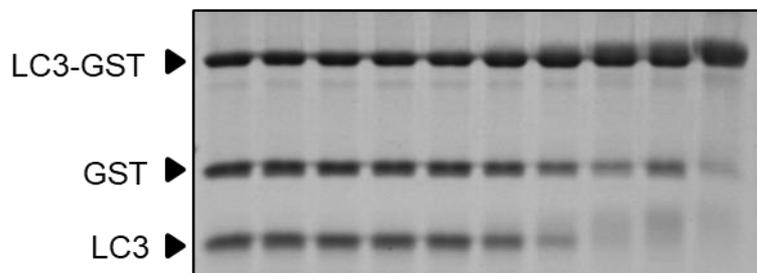
③ *in vitro* cleavage assayによる Atg4B阻害活性評価



- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 - 10 11 12 13 14 15 16 17



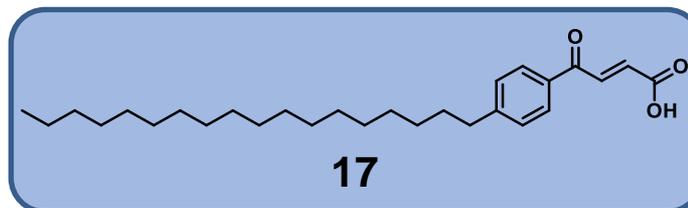
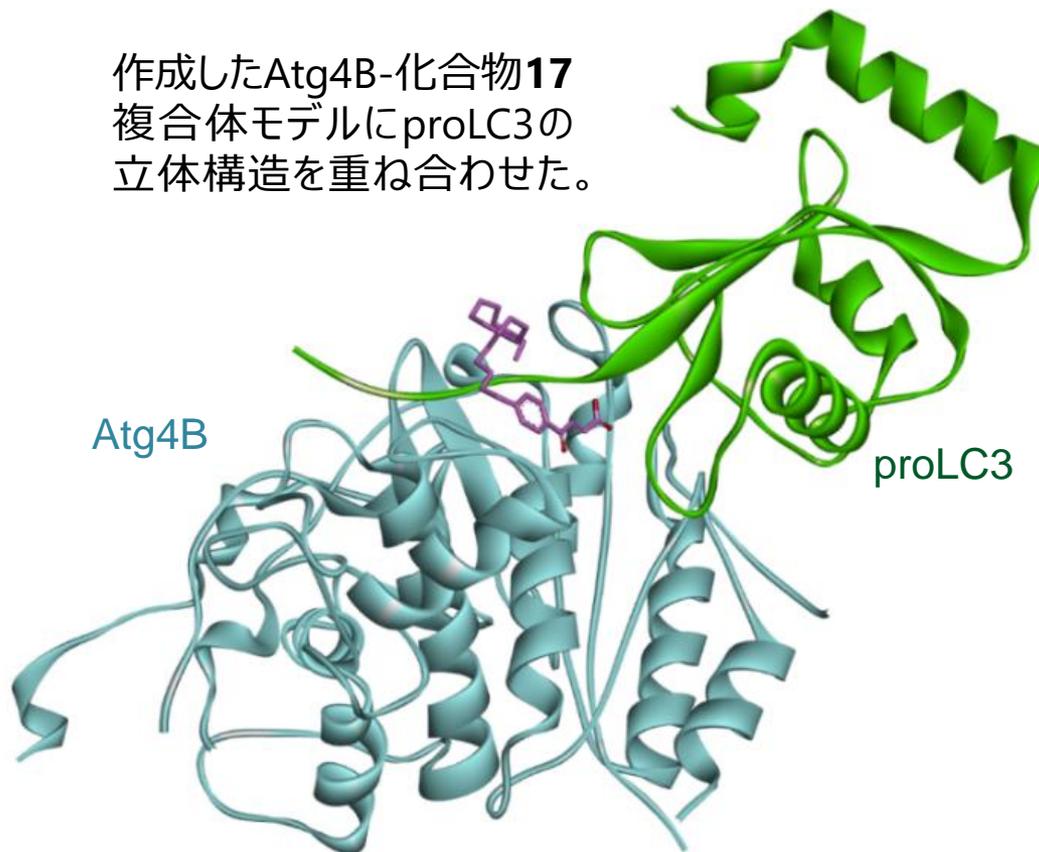
【*in vitro* cleavage assay】



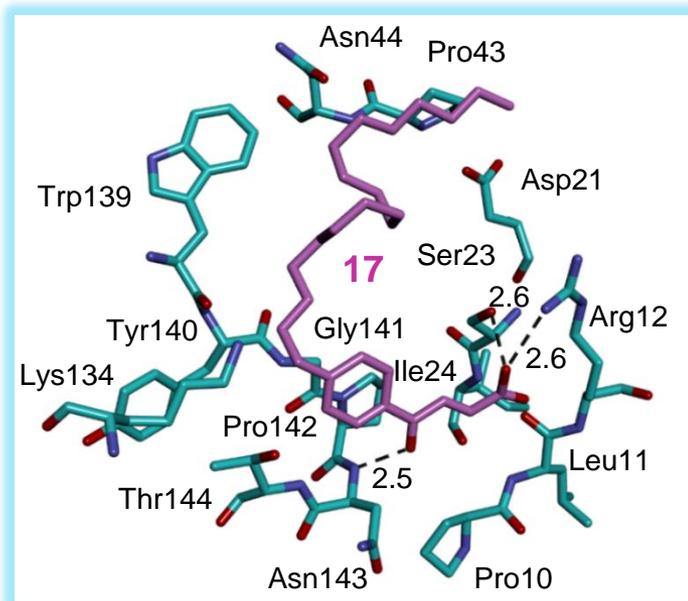
化合物**17**は用量依存的にAtg4BによるLC3-GSTの切断を阻害し、新規Atg4B阻害剤であることが示された。

【Docking model of **17**】

作成したAtg4B-化合物**17**複合体モデルにproLC3の立体構造を重ね合わせた。

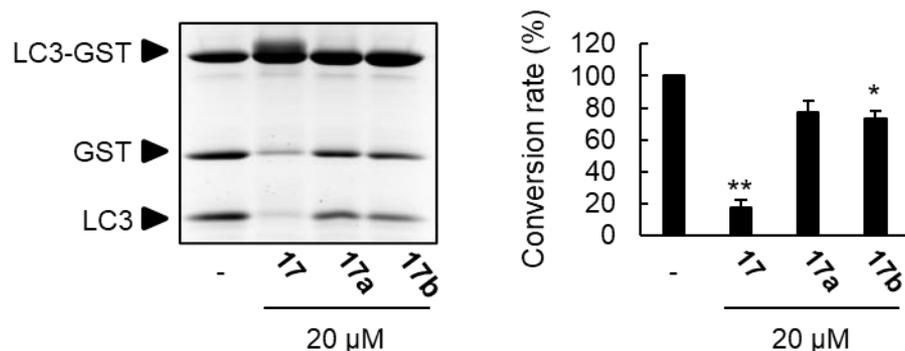
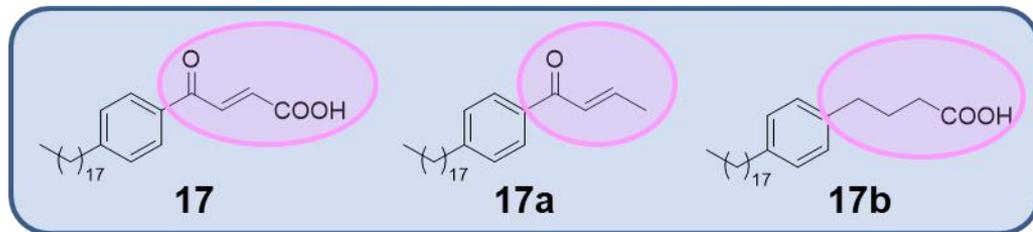


【Binding mode of 17】

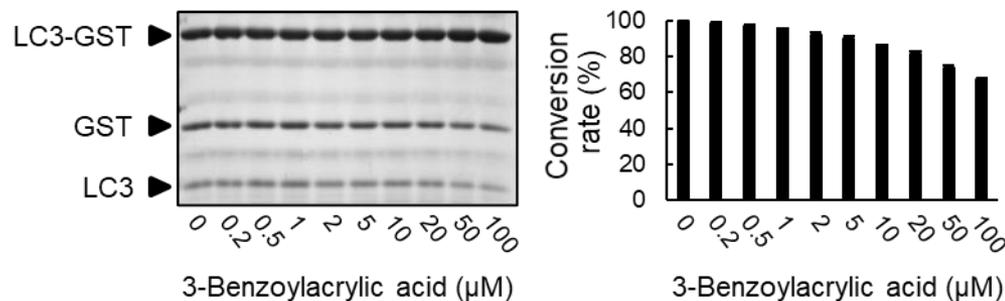
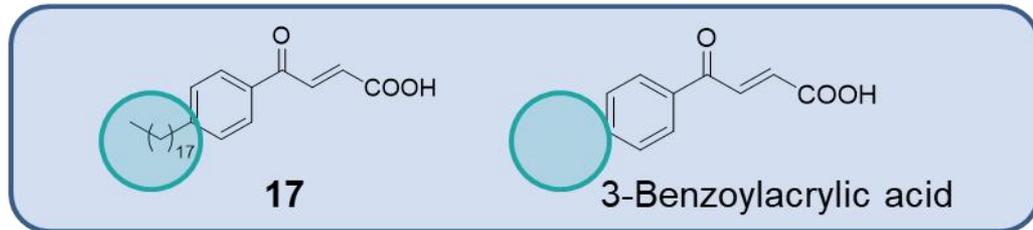


- ドッキングモデルから、化合物17のカルボキシル基とカルボニル基は、それぞれArg12側鎖とAsn143主鎖と水素結合可能であると予想された。

- 類縁体の構造活性相関から、カルボキシル基とカルボニル基を含む部分構造が活性だけでなく、長いアルキル鎖も活性に重要であることが示唆された。



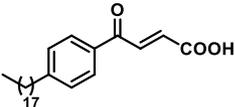
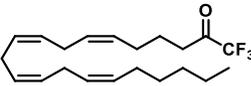
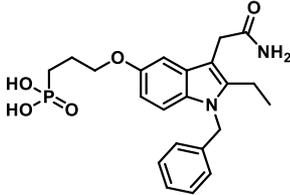
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs DMSO



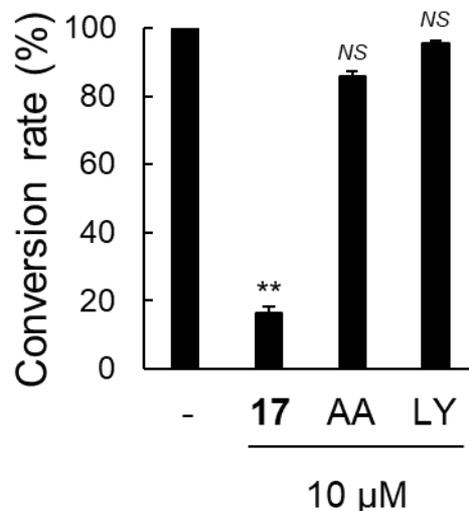
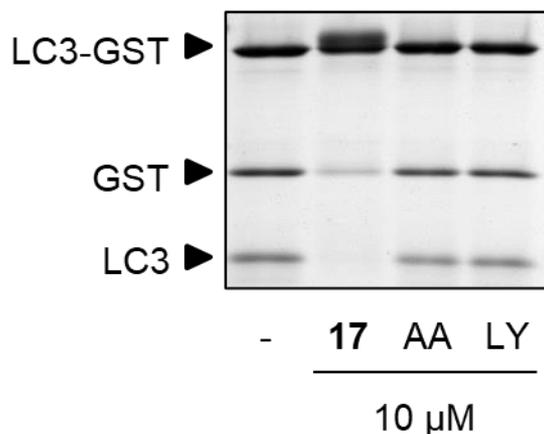
化合物17のAtg4B阻害活性におけるPLA₂阻害活性の関与の否定

化合物17はphospholipase A₂ (PLA₂) 阻害剤OBAAとして知られるため、PLA₂阻害活性が前述の*in vitro* cleavage assayに影響しないか、その他のPLA₂阻害剤AACOCF₃とLY311727を用いて評価した。

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

PLA ₂ inhibitors	17 (OBAA)	AACOCF ₃ (AA)	LY311727 (LY)
Structures			

【*in vitro* cleavage assay】

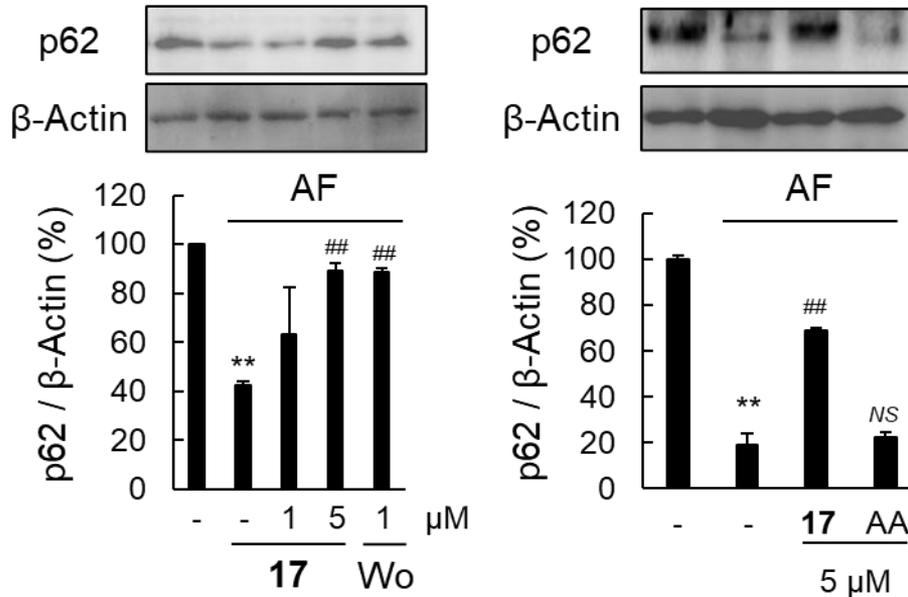


- 化合物17以外のPLA₂阻害剤AACOCF₃とLY311727はAtg4BによるLC3-GSTの切断を阻害しなかった。

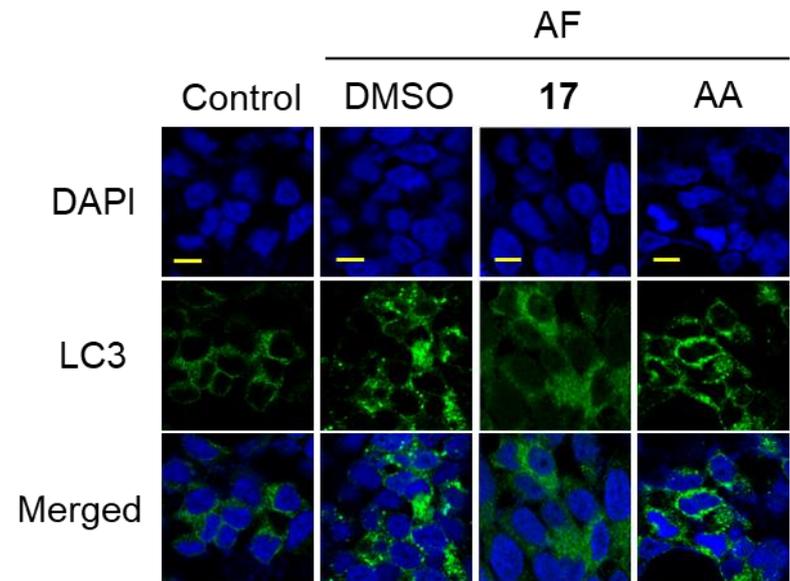
** $p < 0.01$ vs DMSO, ^{NS} $p > 0.05$ vs 17

次に、前立腺癌LNCaP細胞を用いて、化合物17のオートファジー阻害活性を評価した。実験的オートファジーは、アミノ酸枯渇培地 (AF) で3時間培養することによって誘導した。

【Western blotting (WB)】



【Immunofluorescence staining (IF)】



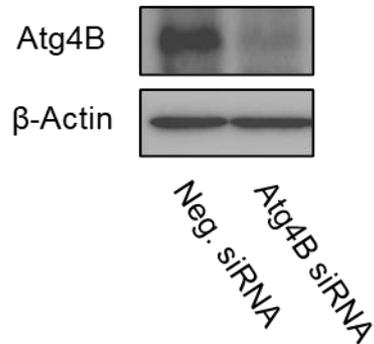
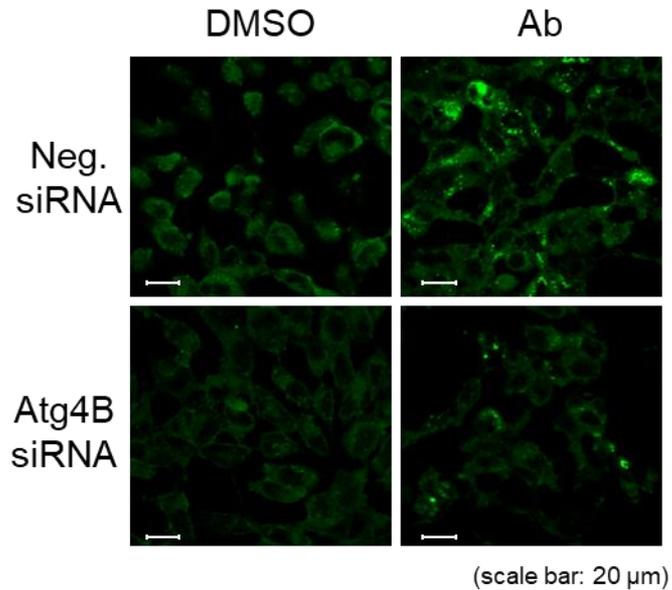
(scale bar: 10 μ m)

Wo; wortmannin (a PI3K inhibitor)

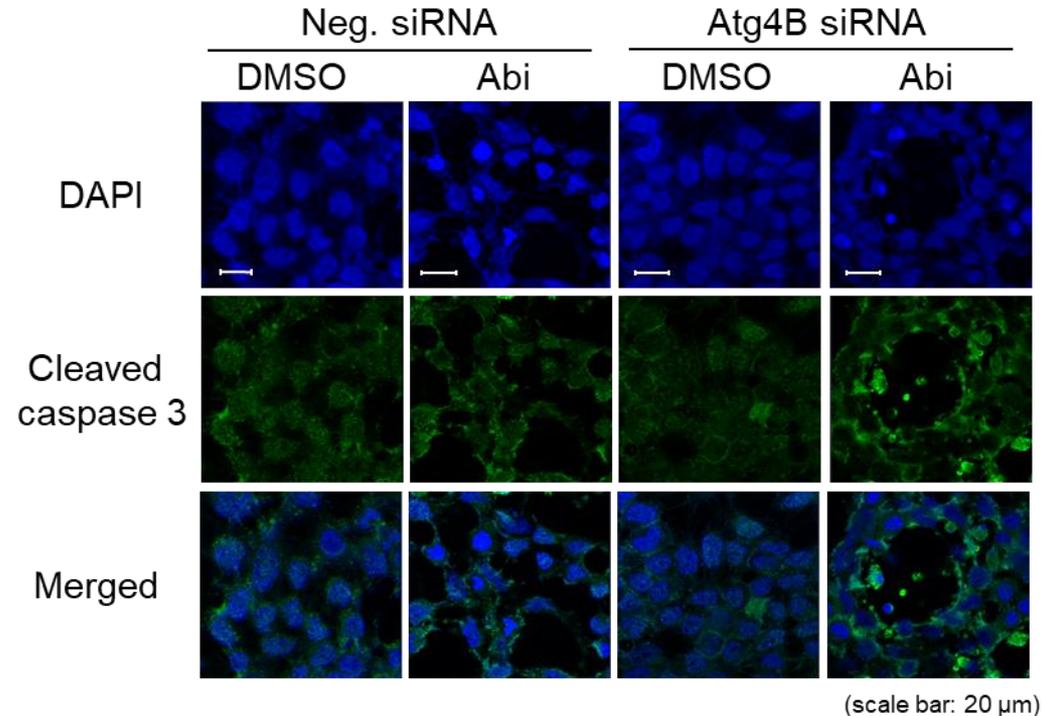
** $p < 0.01$ vs DMSO, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$, NS $p > 0.05$ vs AF alone

- アミノ酸枯渇培地で処理したところ、オートファジー基質p62タンパク質量の減少とLC3の凝集の増加が認められた。化合物17の前処理はPI3K阻害剤wortmanninと同様にp62タンパク発現量を有意に増加させ、LC3凝集を抑制した。
⇒化合物17はオートファジー阻害活性を示した。
- 一方、PLA₂阻害剤AACOCF₃ (AA) はオートファジー阻害活性を示さなかった。

【DAPGreen staining】



【Immunofluorescence staining (IF)】

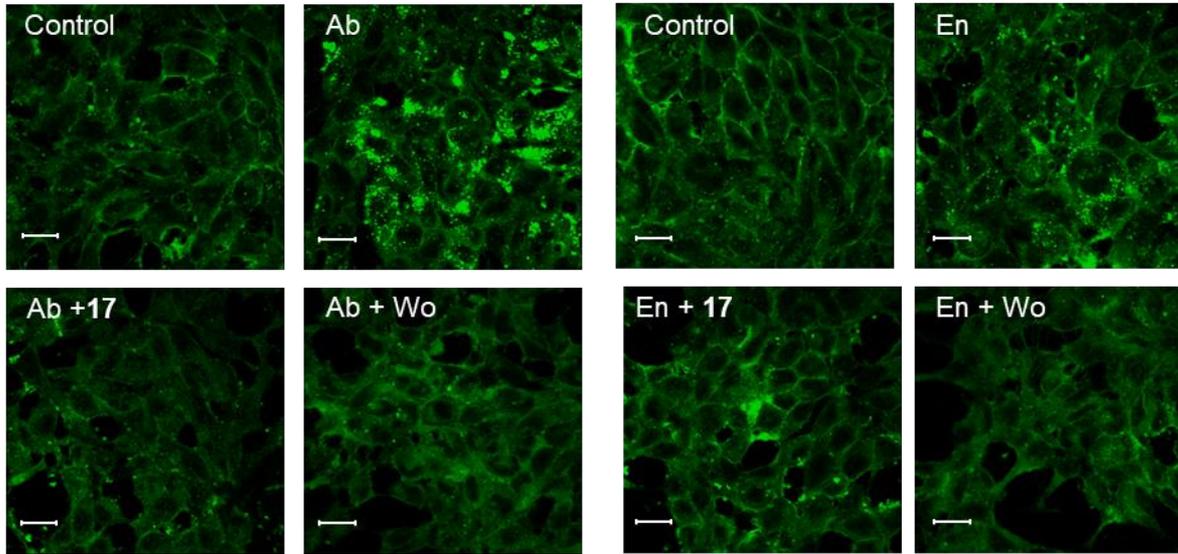


オートファジー阻害によって去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 治療薬 abirateroneの抗癌活性が増強されることが相次いで報告された。

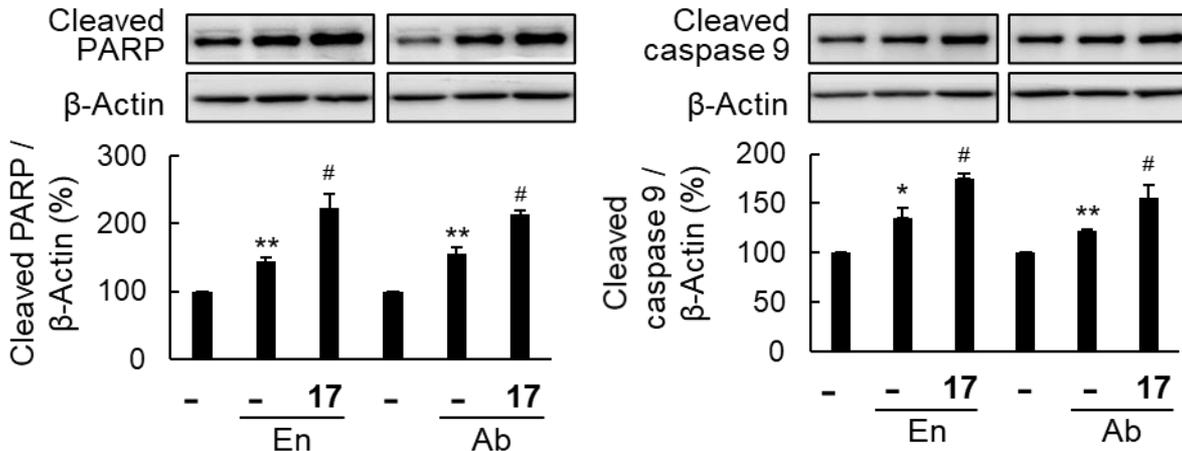
[Mortezavi et al., *World J Urol*, 37, 351 (2019), Ma et al., *Cancer Biother Radiopharm*, 34, 181 (2019)]

Atg4Bサイレンシングによって、abiraterone誘導性のオートファジーの阻害と、アポトーシスの増強が認められた。

【DAPGreen staining】



【WB (アポトーシスマーカー)】

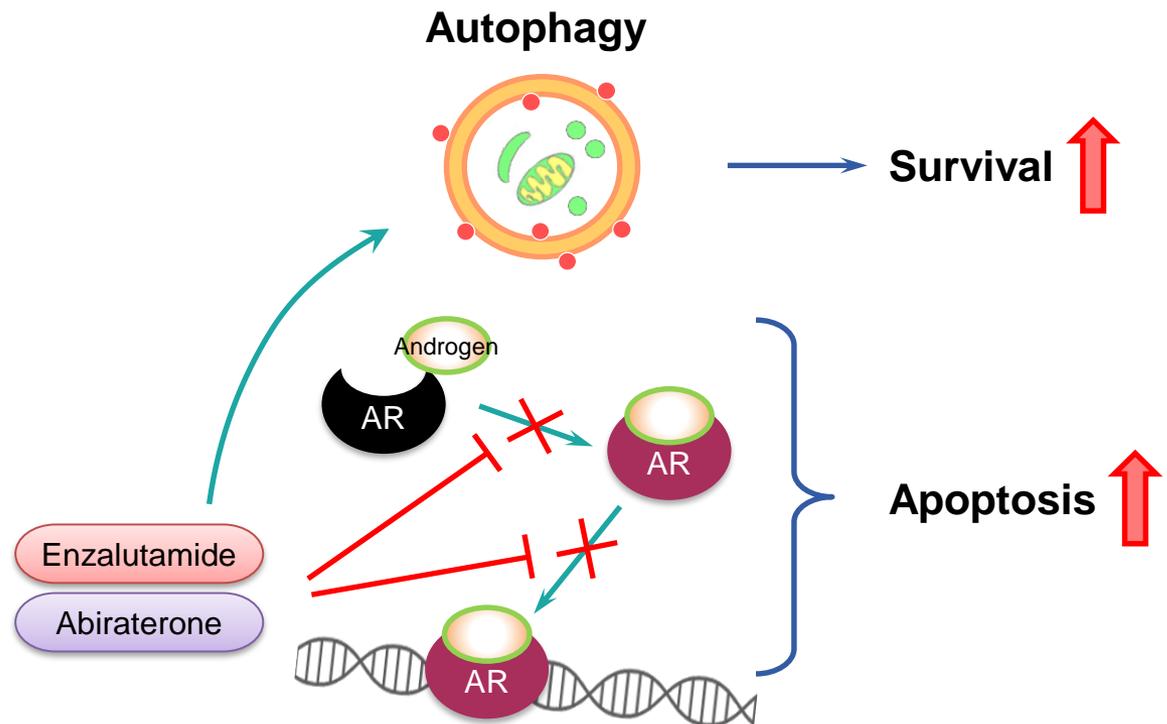
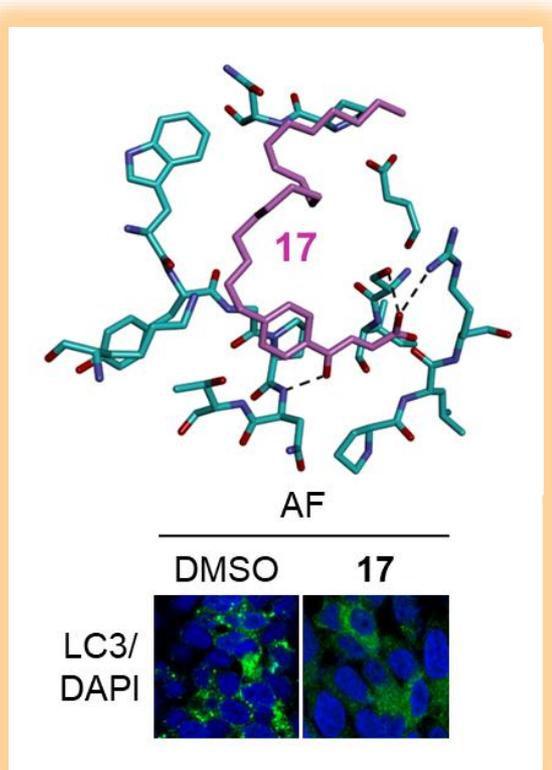


化合物17は、abirateroneとenzalutamide誘導性のオートファジーを阻害し、両薬剤によるアポトーシスを増強した。

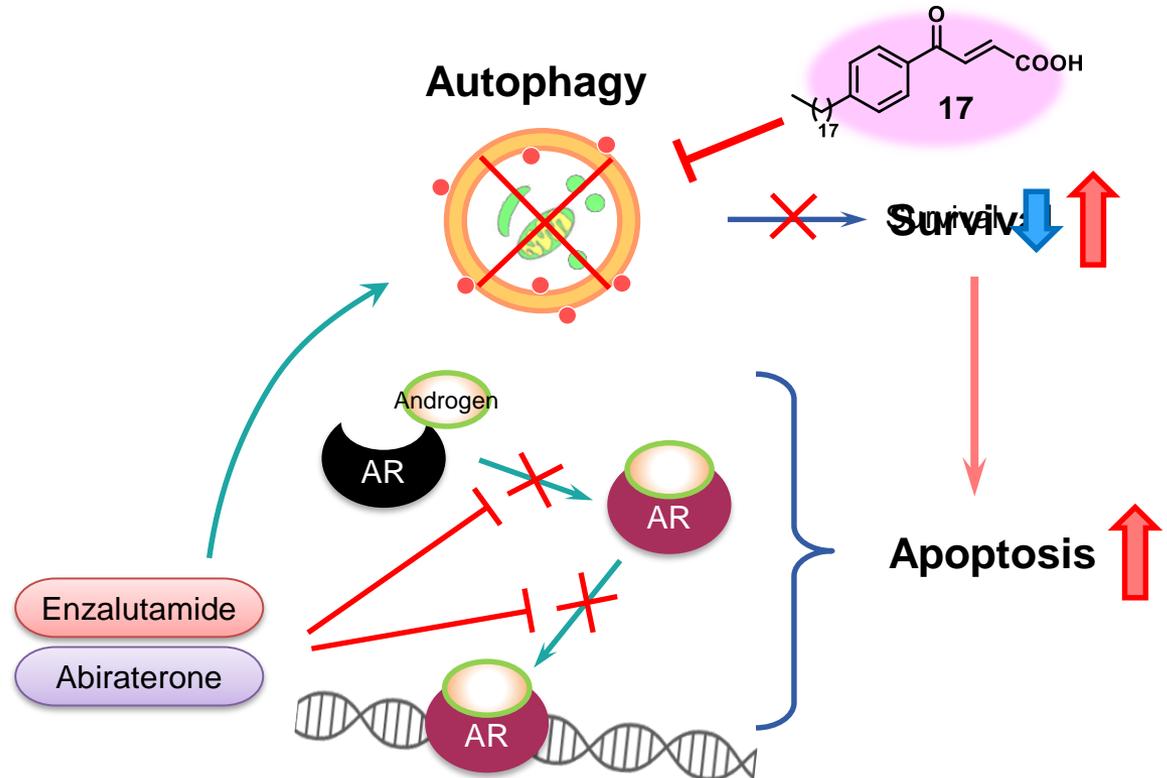
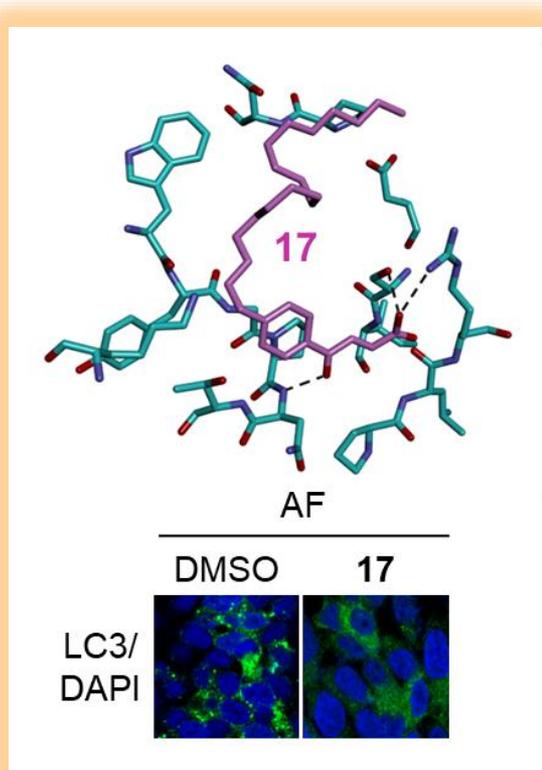
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs DMSO, # $p < 0.05$ vs En or Ab alone

Ab; abiraterone
En; enzalutamide
Wo; wortmannin (a PI3K inhibitor)

- *in silico*スクリーニングによって、Atg4B阻害を作用点とする新規オートファジー阻害剤**17**を見出した。
- 化合物**17**はPLA₂阻害剤として知られるが、本化合物のAtg4B阻害活性やオートファジー阻害活性にPLA₂阻害活性は関係ないことが示唆された。
- 化合物**17**による前立腺癌治療薬の作用増強効果が示唆された。



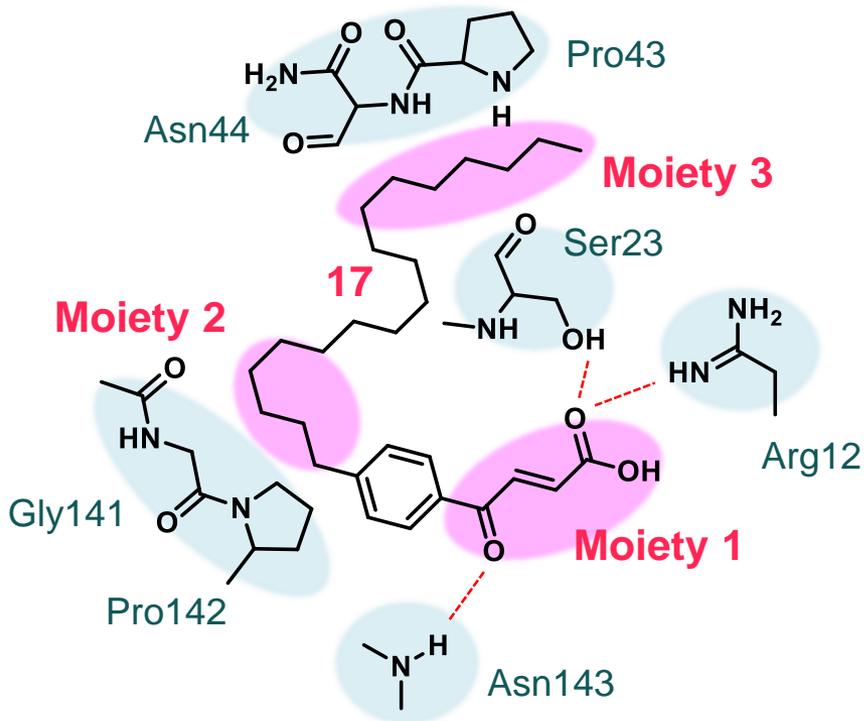
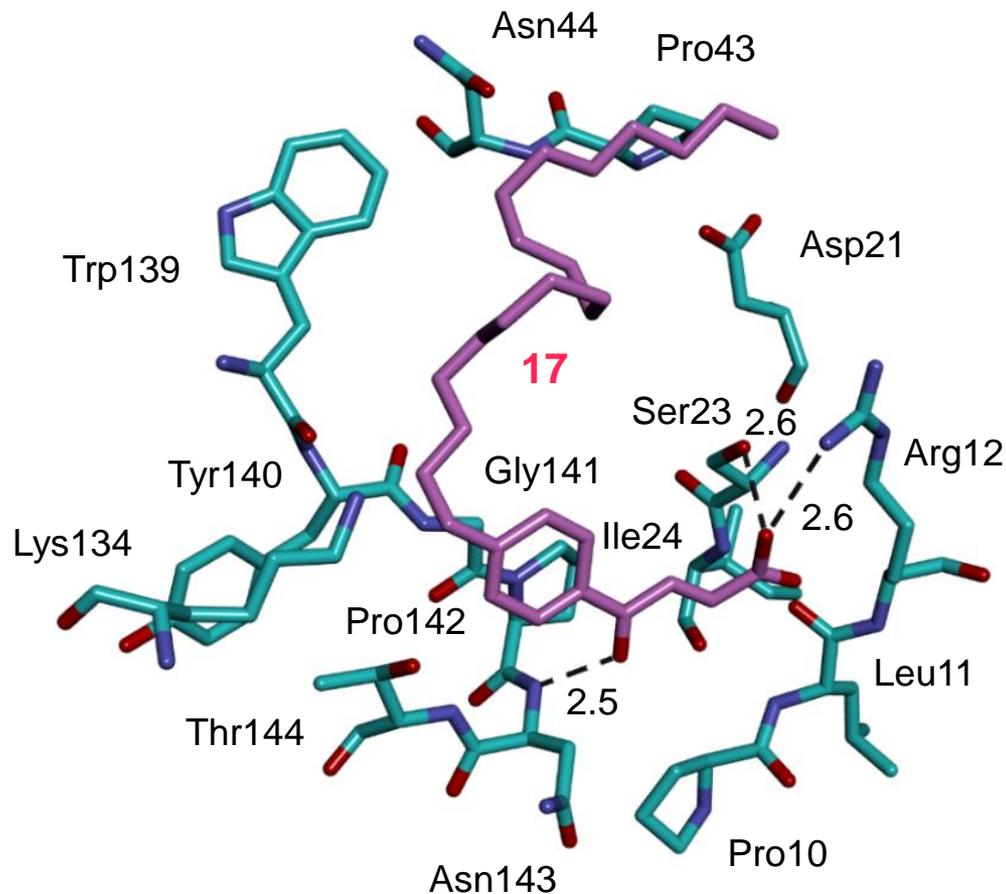
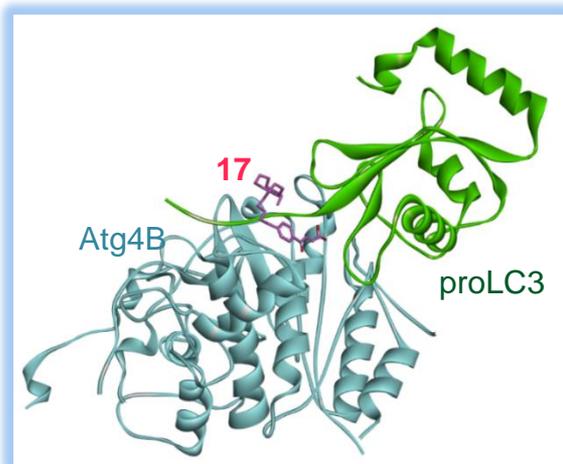
- *in silico*スクリーニングによって、Atg4B阻害を作用点とする新規オートファジー阻害剤**17**を見出した。
- 化合物**17**はPLA₂阻害剤として知られるが、本化合物のAtg4B阻害活性やオートファジー阻害活性にPLA₂阻害活性は関係ないことが示唆された。
- 化合物**17**による前立腺癌治療薬の作用増強効果が示唆された。



【内容】

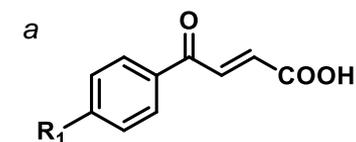
1. Atg4B阻害活性を有するリード化合物の探索
2. 立体構造に基づく構造最適化による強力なAtg4B阻害剤の創製

化合物17の構造最適化



化合物17の構造最適化

R ₁ ^a	Compounds	IC ₅₀ (μM)		Selectivity (Atg4B/PLA ₂ Ratio of compounds to 17)
		for Atg4B	for PLA ₂	
H	3-BAA	584 ± 6.3	n.d. ^b	
C ₃ H ₇	Aup06	130 ± 19	n.d. ^b	
C ₅ H ₁₁	Aup07	36 ± 4.7	30 ± 1.0	208
C ₇ H ₁₅	Aup08	26 ± 2.8	5.9 ± 1.5	58
C ₉ H ₁₉	Aup09	21 ± 3.3	n.d. ^b	
C ₁₀ H ₂₁	Aup15	13 ± 0.3	n.d. ^b	
C ₁₁ H ₂₃	Aup01	11 ± 0.0	3.5 ± 0.3	80
C ₁₂ H ₂₅	Aup16	13 ± 0.6	n.d. ^b	
C ₁₃ H ₂₇	Aup02	21 ± 1.1	7.1 ± 0.9	85
C ₁₅ H ₃₁	Aup03	46 ± 1.0	5.4 ± 0.7	30
C ₁₇ H ₃₅	Aup04	47 ± 5.0	n.d. ^b	
C ₁₈ H ₃₇	17	12 ± 0.3	0.049 ± 0.013	1
C ₁₉ H ₃₉	Aup05	7.3 ± 0.4	0.35 ± 0.13	12
C ₂₁ H ₄₃	Aup10	42 ± 0.8	n.d. ^b	

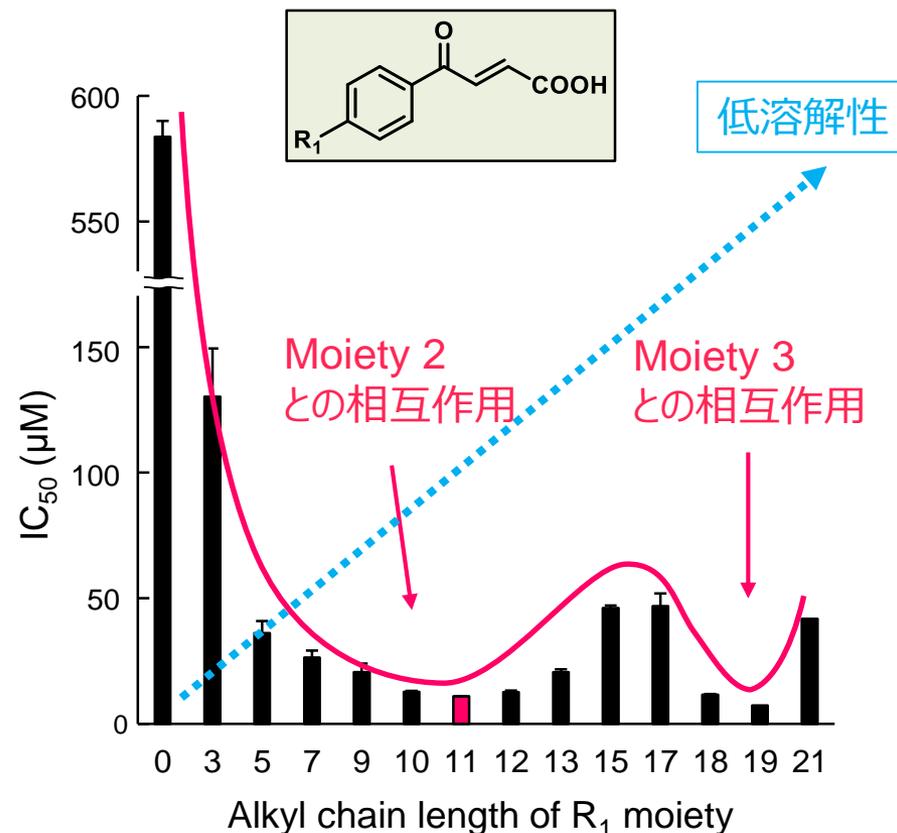
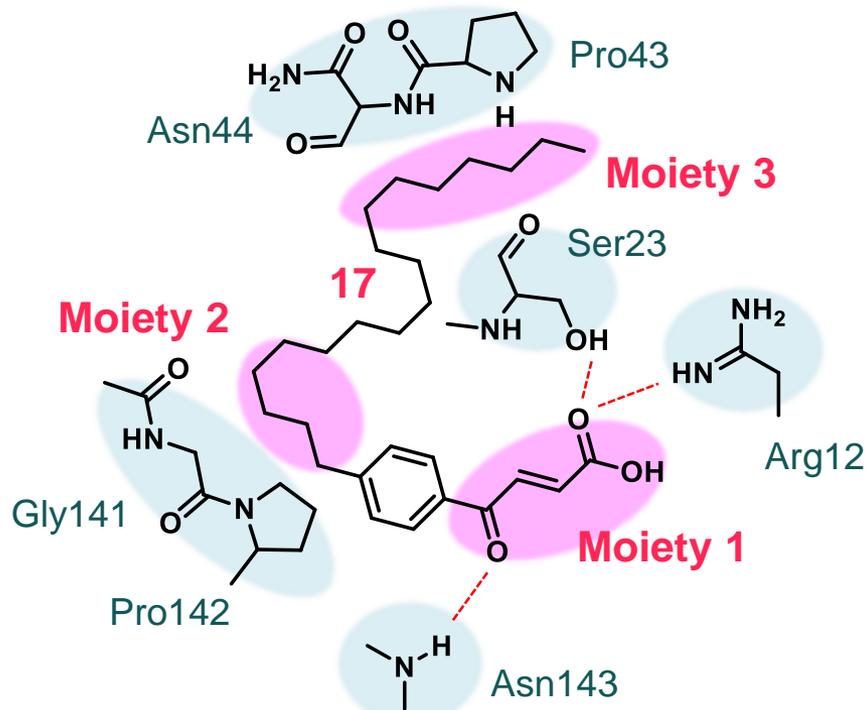


b no data

新規化合物

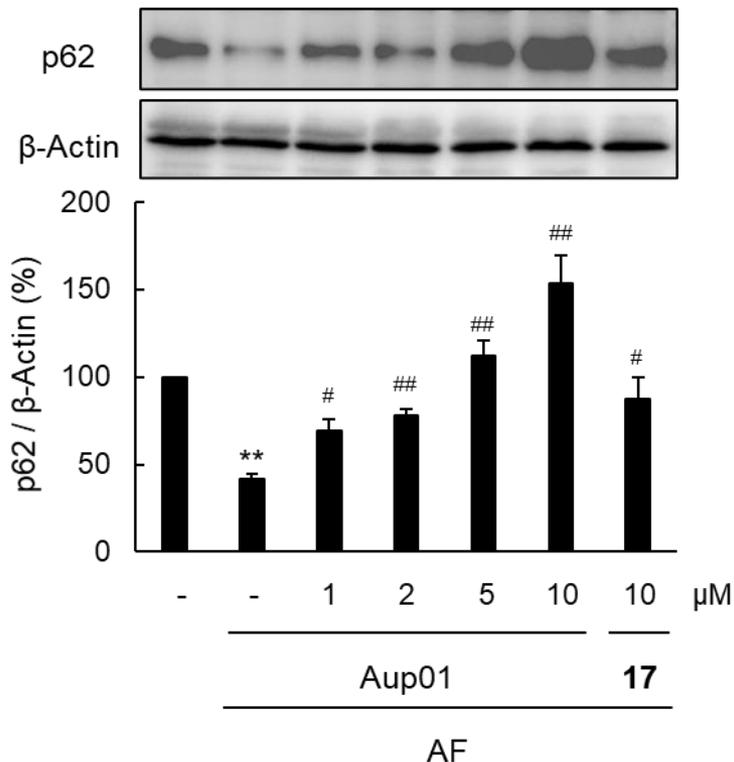


化合物17の構造最適化



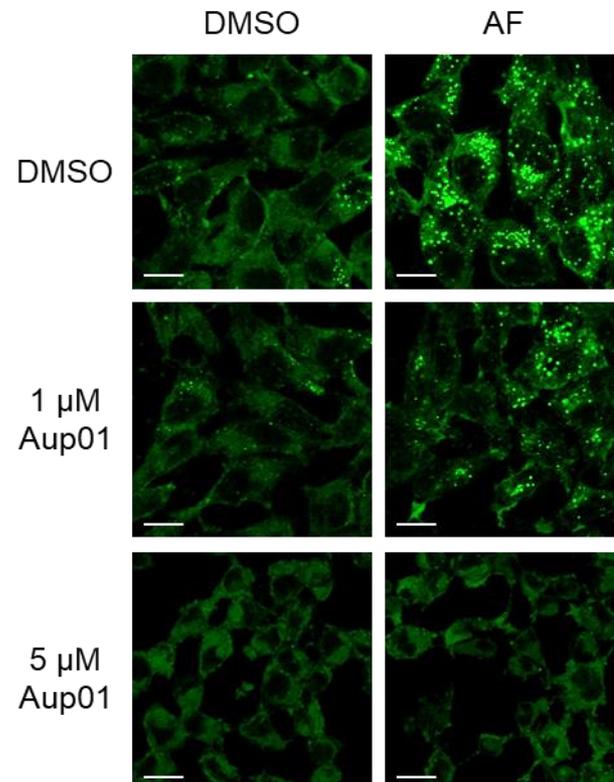
化合物17のR₁部分のアルキル鎖長が延びる程、Atg4B阻害活性は高くなり、アルキル鎖長が11のAup01が最も高い活性を示した。また、アルキル鎖長が13以上では活性の低下が認められたが、アルキル鎖長18、19で再度活性の上昇が認められた。これは上記のMoietiy 3との相互作用を新たに獲得したからと予想される。

【WB (オートファジー基質p62)】



** $p < 0.01$ vs DMSO, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ vs AF alone

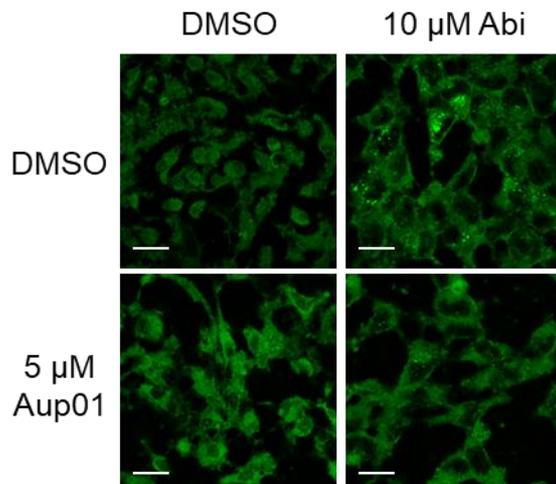
【DAPGreen staining】



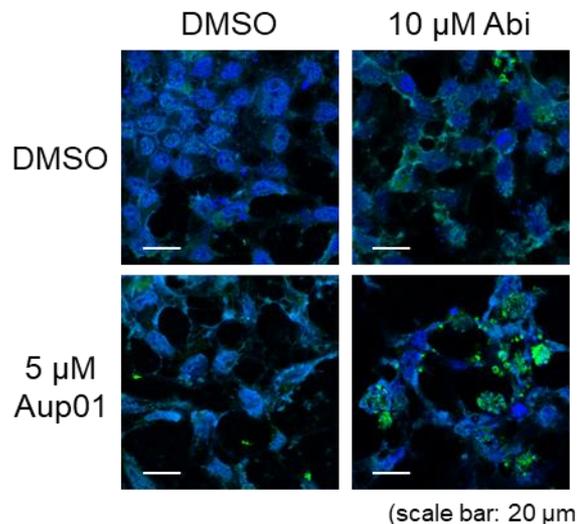
(scale bar: 20 μ m)

- Aup01はアミノ酸枯渇培地処理で減少したp62発現量を用量依存的に回復させ、その効果は化合物**17**より強力であった。また、アミノ酸枯渇培地処理で増加したDAPGreen蛍光を減少させた。
⇒ Aup01のオートファジー阻害活性が示された。

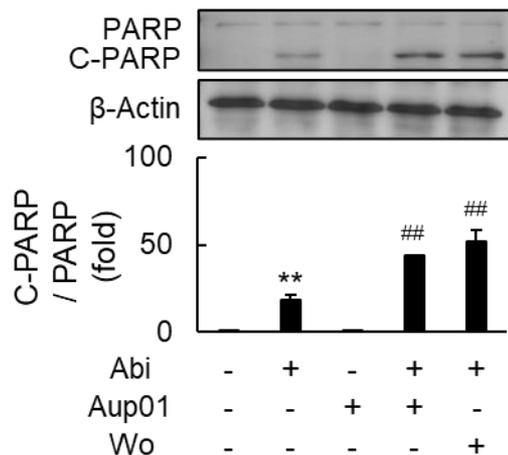
【DAPGreen staining】



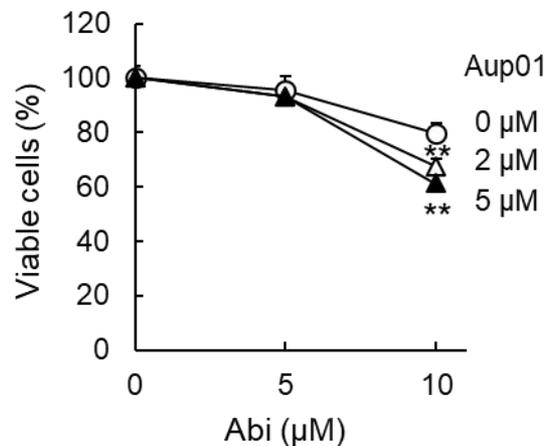
【IF (Cleaved caspase-3)】



【WB (アポトーシスマーカー)】



【生細胞数測定】

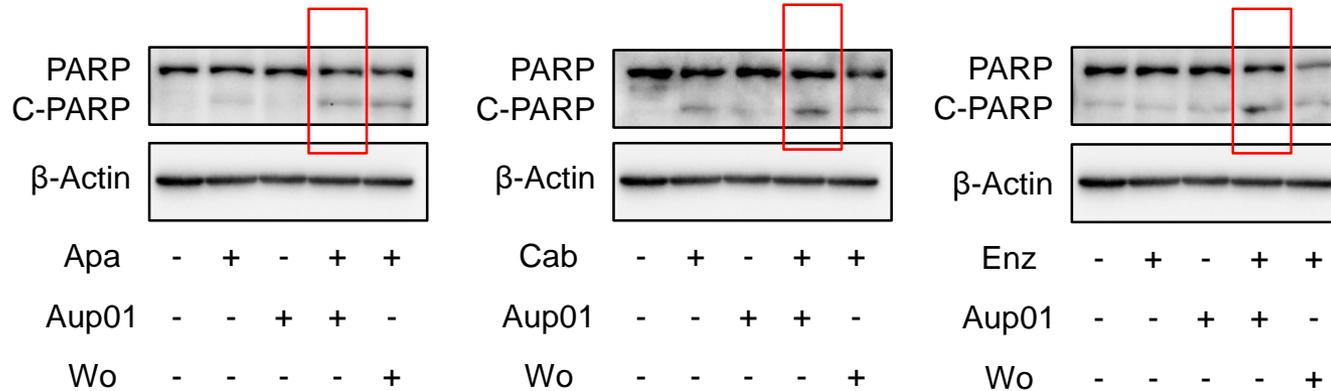


Aup01はアビラテロン誘導性オートファジーを抑制し、アビラテロンによるアポトーシス性細胞死を有意に増強した。

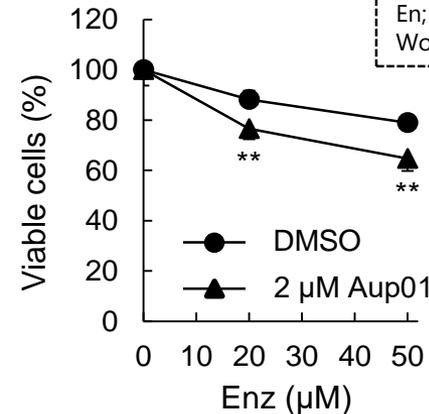
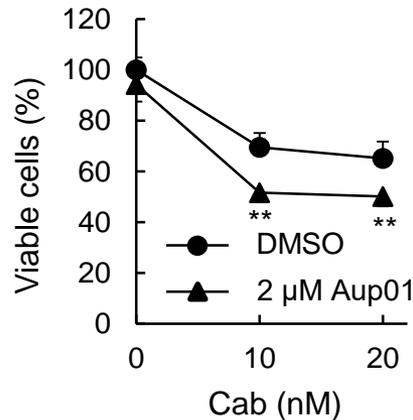
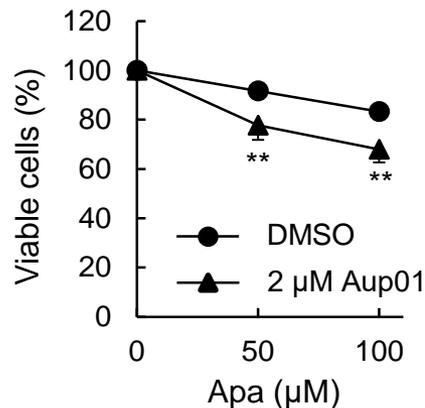
Ab; abiraterone
Wo; wortmannin (a PI3K inhibitor)

** $p < 0.01$ vs DMSO, ## $p < 0.01$ vs Abi alone

【WB (アポトーシスマーカー)】



【生細胞数測定】



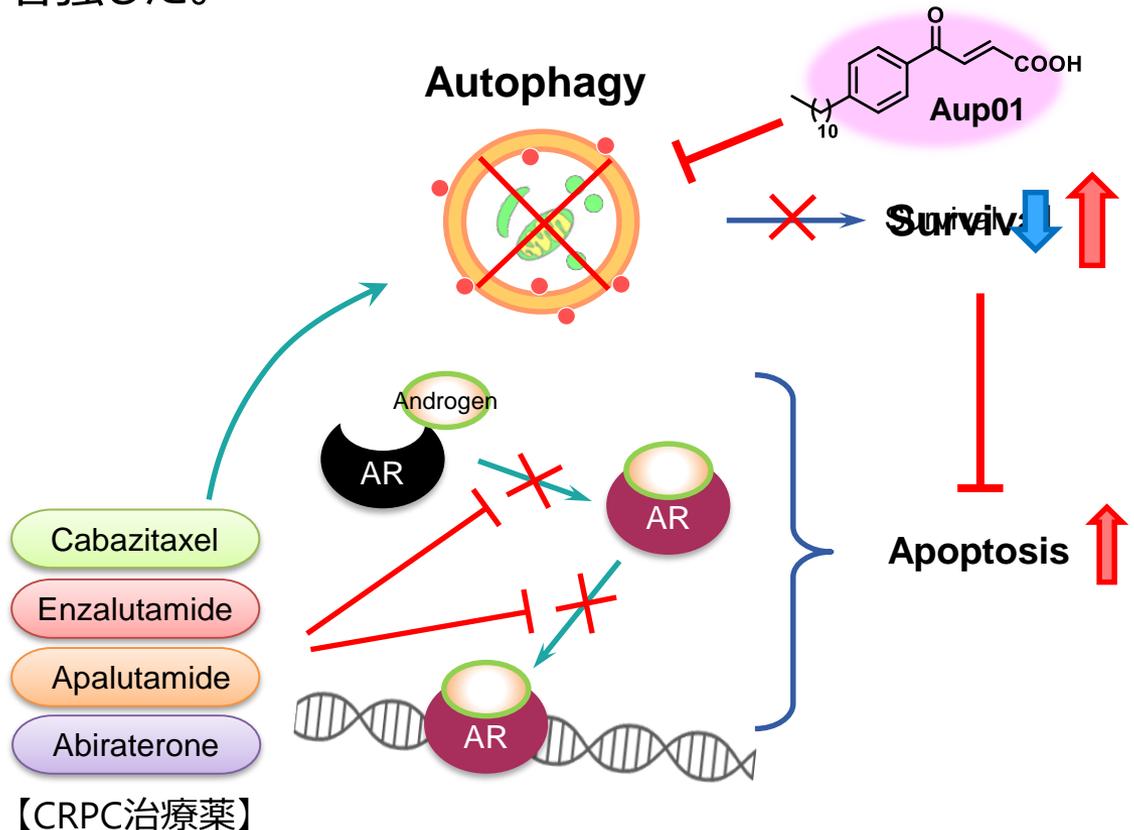
Apa; apalutamide
Cab; cabazitaxel
En; enzalutamide
Wo; wortmannin (a PI3K inhibitor)

** $p < 0.01$ vs DMSO

Aup01はAbiraterone以外のCRPC治療薬であるApalutamide (Apa)、Cabazitaxel (Cab)、Enzalutamide (Enz) の抗がん活性も有意に増強した。

- *In silico*スクリーニングを用いて見出した新規Atg4B阻害剤**17**をリードとし、阻害活性と阻害選択性を向上させた新規阻害剤Aup01の創製に成功した。
- Aup01は前立腺がん細胞で誘導されるオートファジーを低濃度で阻害し、CRPC治療薬のアポトーシス性細胞死を増強した。

⇒ 新規Atg4B阻害剤Aup01は既存の抗がん剤の作用増強を可能にする新規がんアジュバント薬になると期待される。



- 研究試薬としてのAtg4B阻害剤
- 研究試薬としてのオートファジー特異的阻害剤
- 既存薬との併用によって、作用増強および耐性化抑制効果を示すがんアジュバンド薬
- 既存薬に対して抵抗性を獲得したがん細胞に対する抗がん剤耐性克服薬

- 発明の名称 : 新規オートファジー阻害剤としてのAtg4B阻害剤
 - 出願番号 : 特願2019-54702
 - 出願人 : 岐阜市、岐阜大学、長崎大学
 - 発明者 : 遠藤智史、松永俊之、五十里彰、鎌足雄司、田中義正
-
- 発明の名称 : オートファジー阻害剤
 - 出願番号 : 特願2020-157505
 - 出願人 : 岐阜市、富山大学、産業医科大学
 - 発明者 : 遠藤智史、五十里彰、岡田卓哉、豊岡尚樹、藤本直浩

岐阜薬科大学

◎生命薬学大講座 生化学研究室 遠藤 智史

TEL 058-230-8100 (内線3669)

FAX 058-230-8105

e-mail sendo@gifu-pu.ac.jp

◎事務局 庶務会計課 坂元 辰乃介

TEL 058-230-8100

FAX 058-230-8200

e-mail syomuk@gifu-pu.ac.jp