

《様式B》

研究テーマ 「臨床応用を目指した AI 論理創薬によるオートファジー選択的阻害剤  
の創製」

研究責任者 所属機関名 岐阜薬科大学

官職又は役職 准教授

氏 名 遠藤 智史 メールアドレス sendo@gifu-pu.ac.jp

共同研究者 所属機関名 富山大学

官職又は役職 教授

氏 名 豊岡 尚樹

(令和2年度募集) 第33回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

現在のがん治療の基本である多剤併用療法では異なる作用機序の薬剤を用いることで、治療抵抗性の改善や各薬剤の用量を減らすことによる副作用の軽減が可能になる。免疫チェックポイント阻害薬は最も成功した抗がん剤併用薬の1つであり、PD-1/PD-L1 抗体の導入によって完全寛解に至る例は少なくないが、有効症例が 10-20%とも報告されている。そこで、免疫チェックポイント以外に抗がん剤の作用増強が可能な新規抗がん剤併用薬の開発を望まれている。がん細胞ではホメオスタシス制御に重要なオートファジー/リソソーム系が亢進し、がん細胞の生存や抗がん剤耐性化に関与することが知られる。また、抗がん剤処理時や抗がん剤耐性獲得時にはオートファジー活性がさらに高くなることも知られる。そのため、オートファジー阻害剤は新規抗がん剤併用薬の候補として考えられるが、オートファジーを選択的阻害剤の開発は進んでいない。

最近、オートファジーに重要な Atg4B の阻害剤として化合物 X を見出した。今回、速度論的解析によって化合物 X が Atg4B を可逆的かつ競合的に阻害することを明らかにした。また、その誘導体を合成し、計算科学的手法と構造活性相関によって、細胞レベルでオートファジー阻害が可能な新規 Atg4B 阻害剤の創製に成功した。得られた Atg4B 阻害剤は、前立腺がん細胞を用いた実験において、前立腺がん治療薬によって誘導されたオートファジーを阻害し、アポトーシス性細胞死を増強したことから新規抗がん剤併用薬として有用であると期待される。今後は、AI デザインによって得られた誘導体の中から新たに有機合成出来た化合物についてさら

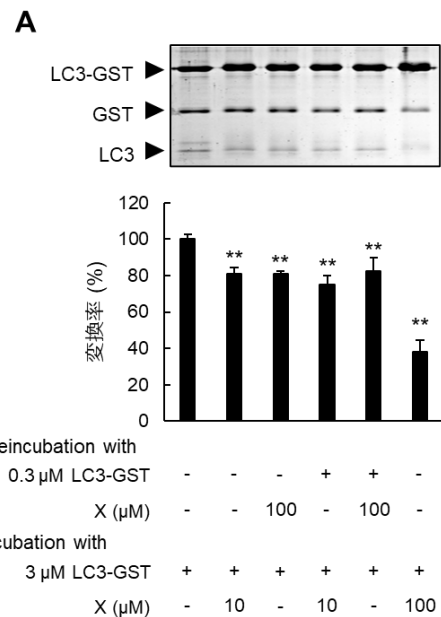
に評価を進めていき、担がんマウスを用いた *in vivo* 抗腫瘍効果試験、薬物動態試験や安全性試験など非臨床試験へと展開していく予定である。得られた成果については、今後、特許出願につなげ、実用化を目指したい。

## 2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

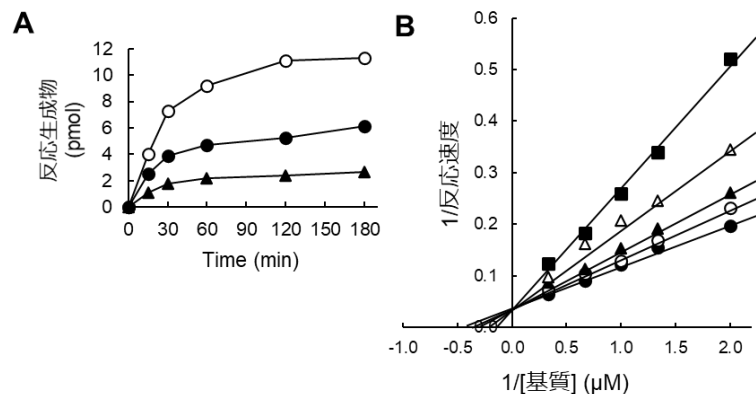
### ①リード化合物による Atg4B 阻害活性評価

オートファジーはリソソームによるタンパク質分解機構の 1 つであり、不要な細胞質成分や細胞小器官及び病原体の除去に加えて、免疫系や炎症の制御など多くの役割に関与することで、生体の恒常性維持に貢献する。オートファジーは発がん抑制に関与する一方で、がん細胞におけるオートファジーの誘導は、低酸素、低栄養状態、抗がん剤といった様々なストレスに対し防御的に働くことで、生存や抗がん剤耐性化に関与することが報告されている。したがって、オートファジーはがん治療における新たな標的と考えられている。しかし、現在用いられているオートファジー阻害剤は PI3 キナーゼ阻害剤とリソソーム阻害剤のみであり、これらはオートファジー特異的な阻害剤ではない。また、リソソーム阻害剤ヒドロキシクロロキンについて癌治療薬としての臨床試験が進められてきたが、その抗癌活性にオートファジー

阻害が寄与しないことも報告され、がん治療標的としてのオートファジーに疑問を唱える声も出ている。オートファジーに特徴的なイベントの一つにオートファゴソーム膜形成が挙げられる。オートファゴソーム膜形成には proLC3 の C 末を切断し、LC3 に変換するシステインプロ



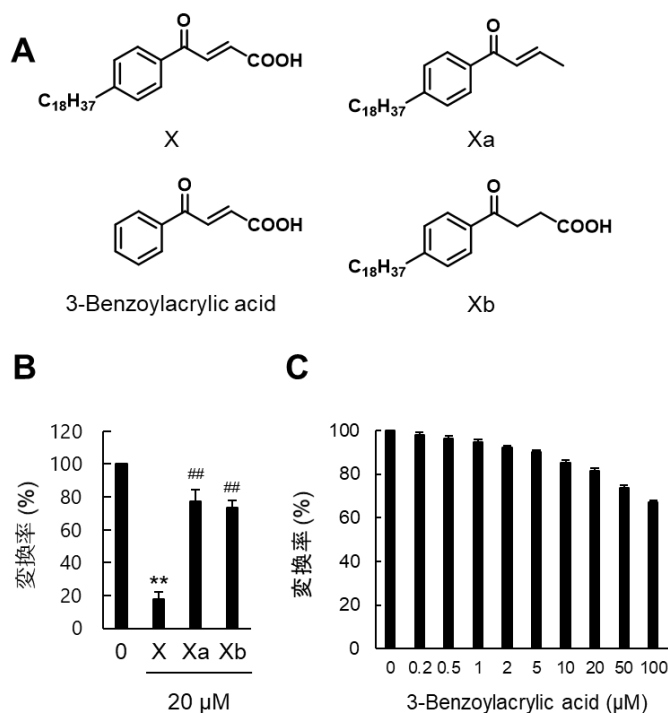
**Fig. 1. XによるAtg4Bの可逆的阻害**  
\*\**p* < 0.01 vs control



**Fig. 2. XによるAtg4B阻害様式**

(A) Rapid inhibition by X. Atg4B (0.1 μM) was incubated with 3 μM LC3-GST and 0 (○), 20 (●) or 50 μM (▲) 17 for 0, 15, 30, 60, 120 or 180 min. (B) Inhibition pattern of 17. Inhibitor concentrations : 0 (●), 1 (○), 2 (▲), 5 (△) and 10 μM (■).

テアーゼ Atg4B が必須であり、Atg4B の不活性変異体の導入は不完全なオートファゴソーム膜ができることが知られる。我々は最近、東京大学創薬機構のライブラリー21 万化合物から *in silico* screening と thermal shift assay によって、Atg4B 阻害活性を有するリード化合物 X を見出した。リード化合物 X は、分子構造内に求電子的な反応基を有しており、共有結合性の相互作用によって不可逆的にタンパク質と結合する可能性が考えられた。そこで、化合物 X が共有結合性のコバレントドラッグであるか検証した (Fig. 1)。前



**Fig. 3. X誘導体によるAtg4B阻害活性**

\*\*p < 0.01 vs control, #p < 0.01 vs X

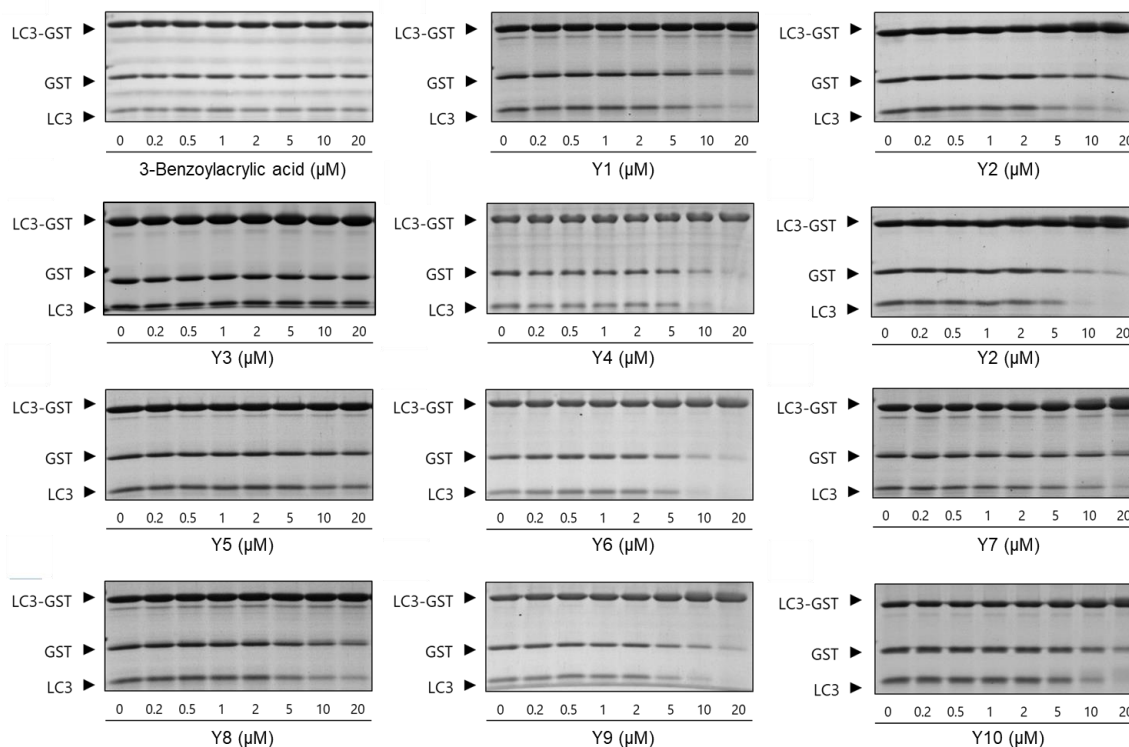
述の通り、Atg4B は LC3 の C 末を切断するため、LC3 の C 末に GST を融合させた LC3-GST のリコンビナントタンパク質を調製し、基質として用いた。LC3-GST と Atg4B を 37 °C で 30 分インキュベートし、反応液を SDS-PAGE に供し、CBB 染色することで、LC3-GST から LC3 と GST への変換率を算出した。Atg4B を化合物 X とプレインキュベーションし、その後、希釈透析後 LC3-GST とインキュベーションした場合、化合物 X とのプレインキュベーションなしで、LC3-GST とのインキュベーション時に化合物 X を添加した場合と阻害の程度は変化がなかった。化合物 X が不可逆的結合をする場合は、プレインキュベーションによって大幅に活性が低下することが予想されるため、化合物 X による Atg4B 阻害活性は非共有性の可逆的阻害であることが明らかとなった。さらに、時間依存的な阻害曲線 (Fig. 2A) から、化合物 X は速やかに Atg4B を阻害することがわかった。このように化合物 X の Atg4B への結合は可逆的かつ瞬時的であることから、化合物 X による阻害を速度論的に検討した (Fig. 2B)。その結果、化合物 X は基質である LC3-GST に対して競合的に作用し、化合物 X の阻害定数 ( $K_i$ ) は  $4.6 \pm 0.26 \mu\text{M}$  を示した。

## ②Atg4B 阻害剤の分子機構の理解

化合物 X による Atg4B 阻害活性の構造的要因を明らかにするために、Atg4B との相互作用が

推定された化合物 X の部分構造を変換した化合物 Xa、Xb を新たに合成した。また、化合物 X のアルキル基を除去した 3-benzoylacrylic acid は市販で購入可能であった。カルボキシル基を除去した化合物 Xa、共役二重結合を除去した化合物 Xb、アルキル鎖を除去した 3-benzoylacrylic acid いずれも化合物 X よりも顕著に活性が低下した (Fig. 3)。したがって、これら部分構造のいずれもが Atg4B 阻害活性に需要であることが示唆された。

化合物とその活性値のデータベースである ChEMBL に登録された部分構造群を参考にして、PipeLine Pilot や MOE を用いてクエリー化合物を土台に網羅的に仮想化合物を発生させ、それらを Glide を用いて受容体にドッキングし、ドッキングスコアが-8.0 以下 (最高-9.627) の上位 280 化合物についてスコアで順位付けを行った (知財化の可能性があるので化合物情報は未公開)。現在、上位スコア化合物の有機合成を行っており、合成が完了次第、生物活性を行う予定をしている。また、分子モデリングによって得られた相互作用をもとに、Y1-Y10 の誘導体を合成し、Atg4B 阻害活性を *in vitro* cleavage assay で評価した (Fig. 4)。いずれも Atg4B を阻害したが、Y4、Y5、Y6 は化合物 X に匹敵する阻害活性を示した。



**Fig. 4. X誘導体 (Y1-Y10) によるAtg4B阻害活性**

### ③細胞レベルでの Atg4B 阻害剤のオートファジー阻害活性評価

オートファジーは正常細胞のホメオスタシスの維持に重要な機能であるが、がん細胞におい

でも低栄養、低酸素、抗がん剤などのストレスから自身を保護するために誘導される。そこで、前立腺がん LNCaP 細胞に前立腺がん治療薬アビラテロン (Abi) で処理した際のオートファジー誘導を検討した。Abi 処理によってオートファジー誘導時に特徴的に生成されるオートファゴソームを検出するプローブ DAPGreen の蛍光強度は増強した (Fig. 5)。Atg4B 阻害剤 Y4 は PI3 キナーゼ阻害を介してオートファジーを阻害する

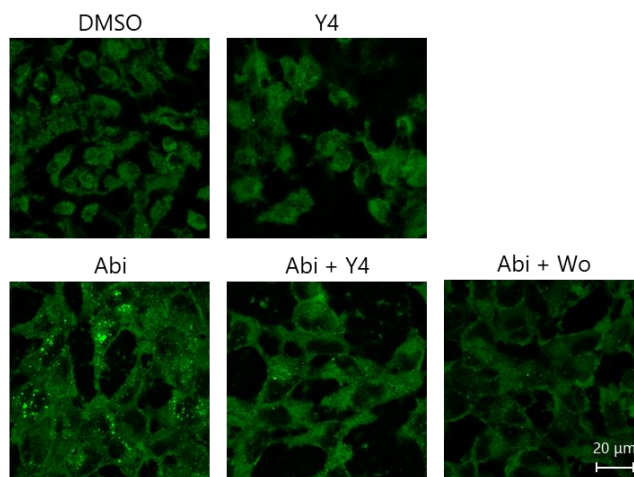


Fig. 5. X誘導体によるオートファジー阻害活性

wortmannin (Wo)

と同様に Abi 誘導性オートファジーを阻害した。次に、Abi による抗がん活性を Atg4B 阻害剤 Y4 が増強するかどうか検討した (Fig. 6)。ミトコンドリア機能障害の指標である Bax/Bcl-2 比は Abi によって増加し、オート

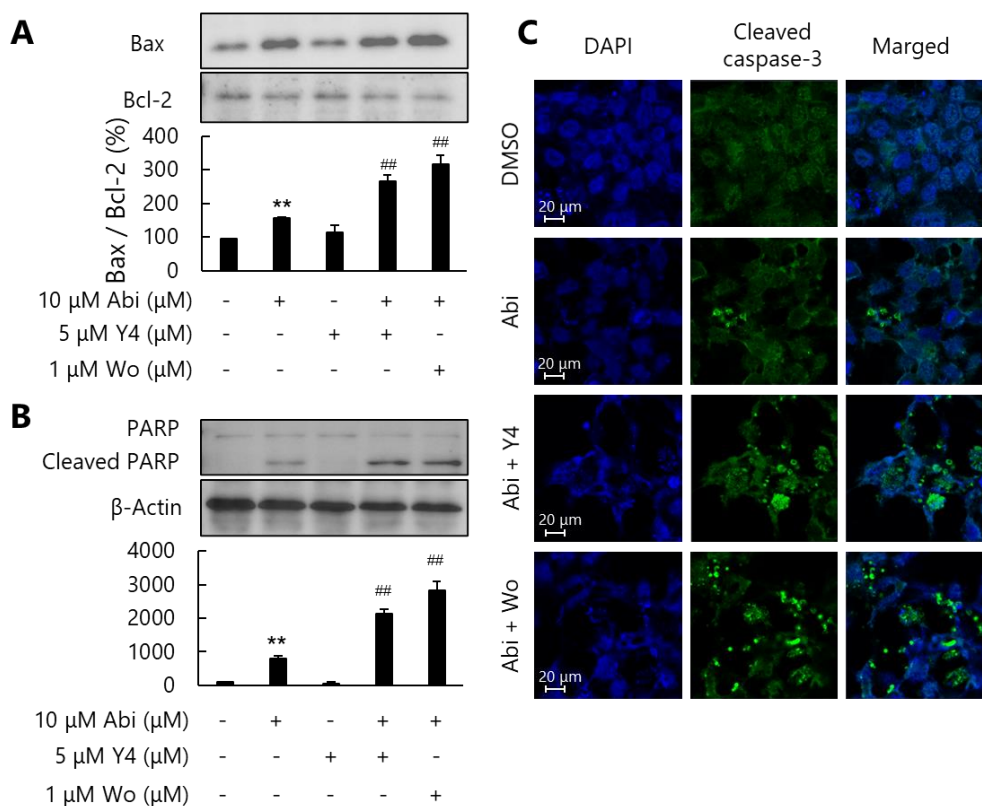
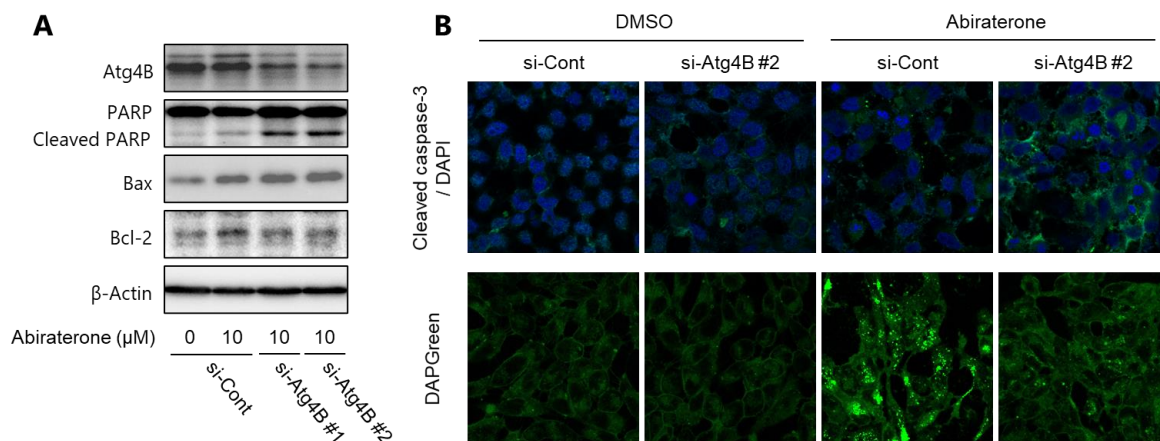


Fig. 6. X誘導体による抗がん剤感受性増強効果

ファジー阻害活性を有する Y4 と Wo の併用によってさらに増加した。また、アポトーシスの指標であった切断型 PARP と切断型カスパーゼ 3 の発現量も Abi 単独処理で増加し、Y4 と Wo の併用によってさらに増強した。これらの結果は、Y4 が Wo と同様にオートファジーを阻害することによって、抗がん剤 Abi によるアポトーシス誘導を増強したことを示唆する。

最後に、Atg4B サイレncingによってオートファジー阻害が起こるかどうか確認した (Fig. 7)。Abi 誘導性の Bax/Bcl-2 比と切断型 PARP 発現量の増大は、Atg4B siRNA の導入によってさ

らに増強された。また、Atg4B siRNA の導入によって Abi 誘導性オートファジーは顕著に抑制された。



**Fig. 7. Atg4Bサイレンシングによる抗がん剤感受性増強効果**

本研究では、抗がん剤の作用増強が可能な新規抗がん剤併用薬の開発を目指し、AI デザインを含めた計算科学的手法を用いて、オートファジーに重要な Atg4B の阻害剤を創製した。得られた新規 Atg4B 阻害剤は、細胞レベルでオートファジーを阻害し、前立腺がん治療薬の抗がん活性を増強したことから、今後、*in vivo* 試験などの非臨床試験へと展開することで、さらにその有用性を実証していき、実用化へと繋げたいと考えている。