

学 位 論 文 題 名

Structure-based Design and Synthesis of Highly Potent and Selective Cyclin-dependent Kinase 4 Inhibitors

(タンパク質の立体構造に基づいた高活性・高選択的
サイクリン依存性キナーゼ 4 阻害剤の設計と合成)

学位論文内容の要旨

真核細胞の細胞周期は G_1 、S、 G_2 、M、 G_0 期にそれぞれ分けて考えることができる。S 期には DNA の複製、M 期には細胞の分裂が行われ、 G_1 及び G_2 期はその間の休止期にあたる。生体内の大部分の細胞は G_1 期及び G_0 期において休止している。また、 G_1 期には最終的に細胞分裂の一連の作業を行なうかどうかの分岐点である R 点 (restriction point) がある。サイクリン D、サイクリン A、サイクリン B、サイクリン E は細胞周期の特定の時期に発現量が増加し、それぞれ対応するサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase, Cdk) と複合体を形成し、様々な基質をリン酸化することによって、次の細胞周期への進行を制御するゲートキーパーの役割を果たしている。その中でも特にサイクリン D-Cdk4 (または Cdk6、以下 Cdk4/6 と表記) は、 G_1 期から S 期への進行を司っている。臨床における癌細胞の実に 40% は、サイクリン D-Cdk4 及びそれに付随する p16 や pRB に変異や欠損が発見されており、サイクリン D-Cdk4/6 による R 点の制御が効かなくなることが、癌細胞の無秩序な増殖の大きな原因となっていることが示唆され、また、その阻害剤が良い抗癌剤になり得るのではないかと期待されている。

Cdk の阻害剤としては、すでに UCN-01 や flavopiridol などが知られており、これらは臨床試験にも進んでいるが、Cdk ファミリー内の選択性はもちろん、他のキナーゼとの間の選択性もほとんどないため、 G_1 だけではなく G_2 期などでも細胞が停止し、副作用も多く認可には至っていない。このため、Cdk4/6 のみを選択的に阻害し G_1 期で特異的に細胞周期を停止させ、副作用も少ない薬剤の開発が期待されている。

本論文において、著者は Cdk4 (/6) に選択的な阻害剤の開発を、Cdk4 の立体構造に基づいて行なった。この開発の過程は以下の 2 段階に分けられる: (1) Cdk4 の立体構造モデルに基づいた新規な Cdk4 阻害剤のリード化合物の創製、(2) Cdk4 とそれ以外のキナーゼの間で置換している残基を同定し、それらの変化を利用した Cdk4 選択的な阻害剤の設計。

第 1 段階のリード創製に関しては、まず X 線結晶解析で立体構造が既知である Cdk2 を基にして homology modeling によって Cdk4 の立体構造のモデルを構築した。構築したモデルを用いて *de novo* design program (タンパク質の構造にもとづいて、その表面に適合する構造を逐次的に構築するプログラム) の一つである LEGEND によってリード化合物の基本骨格を形成する土台

(scaffold)の創製を行なった。*de novo* design program を利用して候補構造を創製する場合、新規な構造を含む様々な構造が得られる反面、創製された構造は、不安定で実際には存在しない構造であったり、合成が非常に難しい構造であったりする場合が多く、従来は実際に化学修飾可能なリード化合物を得ることが非常に難しかった。今回、著者は *de novo* design program の出力構造から結合に必須な部分のみを抜き出し、その部分構造を持つ化合物のうち、市販されていたり、合成が容易なものを検索するシステムとして SEEDS を構築した。そして LEGEND と SEEDS を組み合わせることで 4 種の有望な基本骨格構造の候補を得た。著者はこれらのうち、特に合成が容易な diarylurea に注目し、リード化合物へ導くことにした。

LEGEND が提示した情報と薬物結合部位である ATP binding pocket の特徴を基にして 2 系統の diarylurea 誘導体の化合物群を構築し、Cdk4 の活性を 50% 阻害する濃度 (IC_{50}) が $0.1 \mu M$ である新規人工化合物を得た。この化合物と Cdk4 との結合の様子 (binding mode) を分子力場上で精査 (docking study) した結果を利用して設計した化合物の合成を行ない、さらに高活性 ($IC_{50}=0.042 \mu M$) の化合物を得た。この化合物は pH7.4 の緩衝溶液に溶解するため、浸透法 (soaking method) によって Cdk2 との複合体の結晶を作成し、X 線結晶解析を行ない、この化合物の Cdk2 内における binding mode を決定することができた。この binding mode は前述のリード化合物の Cdk4 内における予測 binding mode と非常に類似しており、構造活性相関も良く説明できる。このことから、これらの新規活性化合物 (リード化合物) が実際の Cdk4 においても、この binding mode によって結合することが強く示唆された。

得られたリード化合物は他のファミリーのキナーゼに対しては数 10 倍以上の選択性を有するが Cdk ファミリー内の Cdk1 や Cdk2 に対しては、2-3 倍の程度の選択性しか持たない。癌細胞を G_1 期で特異的に停止させるためには、Cdk ファミリー内の選択性が必要であり、副作用を抑えるためにはその他のキナーゼに対する選択性も、さらに向上させる必要がある。そこで、著者は次の段階としてリード化合物の Cdk4 選択性を向上させる試みを行なった。

まず、Cdk4 を含む 390 種類のキナーゼのアミノ酸配列のアライメントを行ない、Cdk4 の ATP binding pocket 内のアミノ酸残基のうち、どの残基がどのような頻度でどのような残基に置換しているかを調査した。その結果、ATP binding pocket 内の特定の部位 (p16 binding region) に置換している残基が集中していることをつきとめた。この p16 binding region の Cdk4 におけるアミノ酸残基のみ特異的に結合する構造を、リード化合物の binding mode に基づいて設計し、化合物群を合成した。その結果、Cdk4 に対して高活性・高選択的な新規化合物を得た。この化合物の Cdk4 に対する IC_{50} は $0.0023 \mu M$ であり、Cdk1 と Cdk2 に対してそれぞれ 780 倍、190 倍の選択性を示し、その他のキナーゼに対して 430 倍から 4300 倍以上の選択性を示した。

この高い Cdk4 選択性の原因を docking study の結果と、類縁化合物と mutant Cdk2 (一部の残基を Cdk4 の残基に変異させた Cdk2) の X 線結晶解析の結果を組み合わせることで特定することができた。

この新規化合物は、Rb(+)の癌細胞株 Molt-4 において特異的な G_1 基停止を示すことが確認され、今回用いた一連のタンパク質の構造に基づいた薬物設計手法が非常に有用であることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 村 井 章 夫

副 査 教 授 宮 下 正 昭

副 査 教 授 矢 澤 道 生

副 査 教 授 西 村 紳一郎

学 位 論 文 題 名

Structure-based Design and Synthesis of Highly Potent and Selective Cyclin-dependent Kinase 4 Inhibitors

(タンパク質の立体構造に基づいた高活性・高選択的
サイクリン依存性キナーゼ4阻害剤の設計と合成)

近年、抗癌剤の開発に関する研究が盛んに行われている。しかし、その多くは細胞毒性剤の開発であって、副作用が深刻であり、癌細胞において遺伝子の異常が認められるタンパク質のみを標的とした特異的抗癌剤の開発が待たれている状況にある。真核細胞の細胞周期はG₁期, S期, G₂期, M期, G₀期それぞれ分けて考えることができる。サイクリンDとサイクリン依存性キナーゼ4 (Cdk4)とで形成する複合体は、細胞分裂の休止期であるG₁期からDNA合成期であるS期への進行を司っており、癌細胞においては、この複合体及びそれに附随する遺伝子の変異や欠損などの制御異常が報告されている。この複合体による細胞分裂の一連の作業を行うかどうかの分岐点の制御が効かなくなることが、癌細胞の無秩序な増殖の大きな原因となることが示唆され、その阻害剤が良い抗癌剤になり得るのではないかと期待されている。本論文はこのCdk4に対する特異的阻害剤の開発研究をまとめたものである。

著者は、まずX線結晶解析で立体構造が既知であるCdk2を基とし、homology modelingによるCdk4の立体構造モデルを構築し、このモデルを用いたLEGENDと称するリード化合物の基本骨格形成の土台の創製を行った。それを基に、合成が容易なものを検索するSEEDSと称するシステムを構築した。LEGENDとSEEDSを組み合わせて得られた基本骨格構造のうち、合成が容易なdiarylureaに注目してリード化合物へと導いた。著者は、この化合物とCdk4との結合の様子を分子力場上で精査し、その結果を利用して、Cdk4の活性を50%阻害する濃度(IC₅₀)の向上と他のキナーゼに対する大きな選択性の向上を目指し、多数の化合物の合成を設計した。さらに著者は、Cdk4の特定部位のアミノ酸残基とのみ特異的に結合する構造を設計した結果、Cdk4に対して極めて高活性・高選択的な新規化合物を得た。この化合物のCdk4に対するIC₅₀は0.0023μMであり、Cdk1に対しては780倍、Cdk2に対しては190倍の選択性を示した。又、その他のキナーゼに対しては430倍から4300倍以上の

選択性を示した。このように、この薬物設計手法は、癌細胞において遺伝子の異常が認められるタンパク質を標的とした副作用の軽減が期待される抗癌剤開発であり、従来の細胞毒性剤開発とは概念的に異なる極めて画期的な成果と言える。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。