

## がん診断・治療薬の開発を目的としたインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対する新規リガンドの合成

研究代表者： 牧野 颯 (高エネルギー医学研究センター・助教)

研究代表者： 徳永雄次 (工学部・教授)

概要	
	細胞接着因子であるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ は、がんの増殖、血管新生や浸潤に関与すると考えられており、そのリガンドである RGD 配列を持つペプチドは、がんの治療薬や診断薬として有効であると期待されている。しかしながら、RGD はペプチドであるが故、生体内での代謝に対する安定性や、高い水溶性による動態制御の困難さに問題がある。そこで本研究では、非ペプチド性のインテグリンリガンドの開発を目的とし、新規リガンドをインテグリンの $\alpha$ サブユニット結合部、 $\beta$ サブユニット結合部、それら2つを繋ぐリンカー部の3つに分けて設計し、合成を行った。また合成した化合物について、 $^{125}\text{I}$ 標識エチスタチンを用いた競合阻害実験により、インテグリンとの結合親和性の評価を行った。その結果、インテグリンの $\alpha$ サブユニット結合部と強い結合親和性を示す構造を見出すことに成功した。
関連キーワード	RGD ペプチド、インテグリン、化学合成、競合阻害実験

### 研究の背景および目的

#### 【背景】

細胞接着因子であるインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  は、がんの増殖、血管新生や浸潤に関与すると考えられているため、そのリガンドである RGD 配列を持つペプチドは、がんの治療薬や診断薬として有効とされている。例えば、RGD 配列を持つシレンジタイドは、インテグリン分子に対する分子標的薬であり、悪性グリオーマに対して有効に働くことが大きく期待されている。しかしながらこれらインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  を標的とした診断・治療薬に関する研究は、RGD 配列を持つペプチドが主であるため、吸収・体内動態・代謝などに於いては、似通った性質を示すことが予想される。特に、ペプチドであるが故、代謝（加水分解）に対する安定性と、代謝物の毒性が危惧される。さらには高い水溶性のために、脳血液関門を通過しにくい等の欠点が予想される。

#### 【目的】

上記の課題を解決するため、RGD ペプチドをリード化合物として、非ペプチドリガンドの設計と合成を行い、低い毒性と代謝に対する安定性を併せ持ち、さらに脳への移行が可能な新規がん診断

薬・治療薬の開発を行う。非ペプチドとすることで加水分解に対する安定性を改善する他、脂溶性の高い分子設計を達成し、体内動態の良好な化合物創製を可能とする。

申請者らはこれまで、上記の目的で、分子計算等を駆使し、新しい骨格を持つインテグリンのリガンド設計を実施し、シミュレーションで良い結果が得られた化合物の一部について合成を行った。合成を達成した化合物について、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に対する結合能をエチスタチン（インテグリンリガンド）に対する結合阻害実験によって検討したところ、3種の新規化合物が比較的高い活性を示し、また1種についてはRGDトリペプチドに迫る結合能（エチスタチン結合阻害能）を持つことを見出した。エチスタチン結合阻害能を示した化合物は、インテグリンの  $\alpha$  サブユニット結合部（パートA）と  $\beta$  サブユニット結合部（パートB）とそれらをつなぐスペーサー部の3部位から成り立っている。そこで、本研究ではこれら各部位の構造とインテグリンとの結合能の相関関係を調べることで、インテグリンに対する高い結合能を示す非ペプチドリガンドの創製を目指す。

### 研究の内容および成果

#### 【分子設計と化学合成】

インテグリンの  $\alpha$  サブユニット結合部（パートA）と  $\beta$  サブユニット結合部（パートB）とそれらをつなぐリンカー部の3部位から構成されたイン

テグリン  $\alpha_v\beta_3$  に対する非ペプチドリガンドを以下のように分子設計を行った（図1）。

・パートA： RGD ペプチドでのパートAは水溶性の高いグアニジンであるため、化合物の体内

動態の改善と合成の容易さを考慮し、脂溶性の高いグアニジン類似官能基、特にカルボキシレートと水素結合能がある置換基への変換を行った。

・**パート B**：RGD ペプチド同様に認識部としてカルボキシル基を導入する。これに加えて、周辺に存在する官能基との疎水相互作用や水素結合を期待した官能基導入、並びに、結合においてエントロピー的に有利になるようなカルボキシル基の配座の固定化の検討を行った。

・**リンカー部**：分子の立体構造をある程度固定し、インテグリンとの結合部位となるパート A とパート B の認識部位間距離を適切に維持することが可能な分子設計を施すことが必要となる。そこで、リンカー部位として、2つのベンゼン環を用いることでコンフォメーション変化が少ない構造とした。また、インテグリンへの結合性に対する影響を評価するために、ベンゼン環同士を繋ぐ構造 (X 部) を変更した。更に、2つのベンゼン環を導入することで化合物自体の脂溶性の向上も行う設計である。

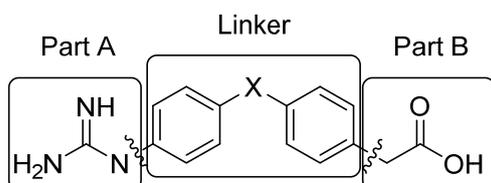


Figure 1. 非ペプチドリガンドの分子設計

上記の概念に従い、新たに設計した分子ならびに、これまでにインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に対して親和性があると考えられている分子の合計 24 化合物 (化合物 1~24) の化学合成を実施した。

#### 【インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対する結合能評価】

合成した化合物 1~24 のインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に対する結合能を  $^{125}\text{I}$  修飾エチスタチンを用いた結合阻害実験によって評価を行った (Figure 2)。

具体的には、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  固定化したウェルにそれぞれ終濃度が 0.1 nM~1 mM と 0.05 nM となるように調製した試験物質 (化合物 1~24) と  $^{125}\text{I}$

修飾エチスタチンを加えた。室温にて 3 時間放置した後各ウェルを洗浄し、ウェル中に残存した放射能 (インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  と結合した  $^{125}\text{I}$  標識エチスタチン) をガンマカウンターにて測定することで、試験物質の  $\text{IC}_{50}$  値を算出した。この時、コントロールとしてインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  のリガンドである RGD ペプチドを用いた。

本研究で合成を行った 24 化合物の中から、10 化合物についてインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  との結合親和性が認められた。しかしながら、これら 10 化合物の結合親和性はインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  と RGD ペプチドとのそれを下回るものであったが、1 化合物 (21) では RGD ペプチドに近い結合阻害活性を示した。

一方、重要な知見として、結合親和性が認められた 10 化合物のうち 9 化合物は、パート A に同一の構造を有していることがわかった。すなわち、本系統の非ペプチドリガンドとインテグリンの結合において、パート A 部が極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これに対して、パート B やリンカー X 部には比較的構造の多様性が認められることから、この両者を最適化することにより、更なる親和性の向上を図る余地があると期待される。また、これらの構造はリガンドの水溶性を制御し、体内での動態制御を可能にするユニットとして、新たな分子設計に展開することが可能であると考えられる。

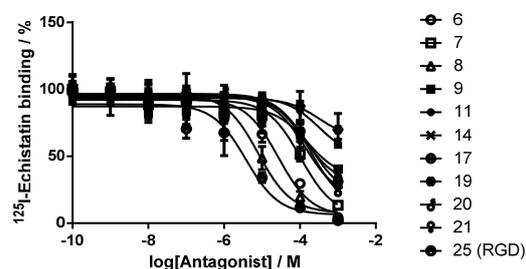


Figure 2.  $^{125}\text{I}$ -エチスタチンと試験物質との競合阻害実験結果 (結合親和性が認められた化合物のみを抽出)

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

本研究成果を Journal of Medicinal Chemistry に投稿予定

### 「特記事項」

特になし

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費補助事業・若手研究 (A)・H26~H28・代表 (牧野 颯)・申請中

日本学術振興会・科学研究費補助事業・挑戦的萌芽研究・H26~H27・代表 (牧野 颯)・申請中

日本学術振興会・科学研究費補助事業・新学術領域研究 (研究領域提案型)・H26~H27・代表 (徳永 雄次)・申請中