

Protein-Protein Interaction を ターゲットとした創薬



PRISM BioLab 株式会社
研究開発本部長

小田上 剛直

おだかみ たけなお

1992年 北海道大学大学院修士課程修了
同年 旭化成工業株式会社入社
2006年 PRISM BioLab株式会社入社
2010年 神戸学院大学 博士(薬学)
同年より現職



PRISM BioLab 株式会社
代表取締役社長

小路 弘行

こうじ ひろゆき

1978年 九州大学大学院修士課程修了
同年 旭化成工業株式会社入社
1989年 神戸大学 学術博士
2001年 旭化成ファーマ株式会社
創薬第一研究所 所長
2006年 同社 研究センター センター長
同年 PRISM BioLab株式会社設立

はじめに

PRISM BioLab 株式会社 (PRISM) は、ペプチド模倣技術を用いて新たな医薬品を創製するベンチャーとして2006年11月に創設された。基本となる技術は、共同創設者である南カリフォルニア大学の Michael Kahn 教授が開発したペプチド模倣技術をもとに PRISM により独自にヘリックス構造に焦点を絞ったライブラリー技術 (以下 PRISM ライブラリー) として開発されたものである。PRISM ライブラリーを用いることで、細胞内蛋白質-蛋白質相互作用を選択的に阻害する化合物を得ることに成功し、最初の臨床開発化合物である PRI-724 は、現在米国においてガンの治療薬を目指して臨床第一相試験を実施中である。以下に PRISM ライブラリーの特徴について、標的である蛋白質-蛋白質相互作用を阻害するメカニズムを含めて説明をしたい。

蛋白質-蛋白質相互作用について

蛋白質-蛋白質相互作用 (以下 PPI) は無数にある生体内での情報伝達において重要な役割を担っている。今や、遺伝子配列解析の飛躍的進歩を背景として、ポストゲノム時代が到来し、プロテオミクスやバイオインフォマティクスの技術によって、生体内における包括的な PPI ネットワークを捉えることが出来るようになった。これによって、特定の PPI を調節することで、その経路

を有する疾病を標的とした治療法の開発が可能となっている。しかしながら、PPI を低分子化合物で阻害することは、酵素阻害剤や受容体の調節剤を標的とした創薬よりも、飛びぬけて難易度が高いのはメディシナルケミストであれば自明であろう。これは、PPI に必要とされる蛋白質表面積が比較的大きいことに起因していると言える。また、PPI 表面は一般的に扁平で、低分子化合物が結合できるようなポケット構造をもつものがないからとも言えるであろう。

PPI において疎水場-疎水場間の相互作用は結合の自由エネルギー変化において大きな役割を持っている。しかしながら、これだけでは PPI は成立せず、“ホットスポット”と呼ばれる自由エネルギー変化が局所的に高くなる小さな領域が存在することもよく知られた事実である。一般的にホットスポットでは親水性、あるいは芳香族のアミノ酸側鎖が高い頻度で見られ、これらの鍵となるアミノ酸側鎖が疎水性残基によってとり囲まれており、溶媒から引き離された状態になっている。これによってホットスポットの誘電係数は下がり、静電的相互作用強度が増強されることによって自由エネルギー変化が局所的に高くなっている。

PPI は、その相互作用面積の大きさから、非常に高い結合定数を持つと考えられるかもしれない。しかしながら、これは事実ではないと言える。PPI とペプチド-蛋白質相互作用を解析した文献¹では、大きな自由エネルギー変化における差は見られず、結合エネルギーという面では生体内の PPI は最適化されていない。この理由

は、ほとんどのシグナル伝達において結合-非結合状態の平衡関係が必要であることが原因であると考えられる。また、PPIに必要な自由エネルギー変化の平均は、蛋白質結合阻害剤のそれよりも下回っている例²が報告されており、低分子でPPIを阻害することは理論上可能である。

PPI 阻害剤のデザインについて

PPIを阻害する低分子をデザインする方法として、蛋白質の二次構造である α -ヘリックス、 β -シート、 β -ストランドに着目することができる。蛋白質の高次構造である四次構造は、これらの二次構造から構成されており、このうち、PPIにおいては、 α -ヘリックス構造が重要な役割を担っている³。

α -ヘリックス構造はファイ (ϕ)、プサイ (Ψ) の二面角が各々 -60° 、 -50° をなすポリペプチドと定義できる。この立体構造では、3.6残基のアミノ酸がヘリックス1回転を構成し、 i 位のアミノ酸残基のアミド結合のCOと $i+4$ 位のアミノ酸残基のアミド結合のNHが水素結合することにより構造が安定化している。 α -ヘリックスは右巻きのらせん構造を取っており、形としては右巻きのネジのような形をしている。一方で α -ヘリックス構造は天然の蛋白質構造の解析結果から、 ϕ 、 Ψ の二面角が各々 -60° 、 -50° を中心値として、ある程度の分散を持つことが知られており、右巻きのらせん構造が若干曲がったり、伸びたりしたものも存在する。

これまでに、 α -ヘリックス模倣化合物の開発はペプチド鎖の α -ヘリックス構造の安定化や α -ヘリックス構造表面の側鎖官能基の立体配座の模倣などを軸として、大きな進展を遂げてきた。しかしながら、 β -ストランドや β -ターンの模倣に比較して α -ヘリックス模倣技術は未だ発展途上だと言える。これは創薬的に強く興味を持たれるPPIにおける α -ヘリックスの普遍的役割から考えて、その報告数が少ないことから明らかである。これはある意味で、 α -ヘリックスの2~3ターンをまたいだ側鎖官能基の模倣が非常に難しいことに起因していると考えられる。更に望ましくは分子量を増大させず、一般的な低分子化合物の範囲にとどめることも必要なため、構造模倣の難易度を高めている。

ここで、 α -ヘリックスの $i, i+1, i+3, i+4$ 位の $C\alpha$ は4~5 Åの距離関係にあり、これはねじれた β -ター

ンの側鎖配置に酷似している。 α -ヘリックスと β -ターンの立体構造類似性は既に報告³されている通りである。 β -ターン模倣化合物が α -ヘリックスを良く模倣する例を図1に示した。本化合物の $i, i+1, i+3, i+4$ 位の $C\alpha$ および $C\beta$ 、8原子におけるRMSD (平均二乗偏差)は0.62 Åであり、 α -ヘリックスを非常に良く模倣している。一方で、先に述べた様に、天然にみられる α -ヘリックスには構造の幅があり、これらの構造を網羅するためにはヘリックス模倣化合物にも構造的多様性が必要だと考えられる。

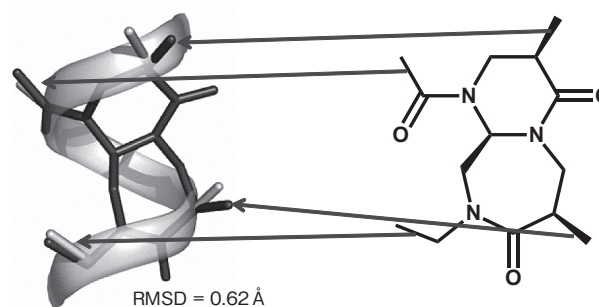


図1 α -ヘリックスと α -ヘリックス模倣化合物の重ね合わせ

PRISM社でのPPI阻害剤開発について

PRISM社では、新規Wntシグナル調節剤の探索研究を行い、独自の α -ヘリックス模倣化合物の研究開発を通じて、PRI-724を創出した。PRI-724は癌細胞で異常亢進しているWntシグナル伝達経路のうち、 β -カテニン依存性の経路を阻害することにより抗癌作用を示すことが期待されている。Wntシグナル伝達経路は様々な癌種において亢進していることが知られており、これまでの実験結果から、各種癌細胞株に対して細胞増殖抑制作用を示すことが明らかになっている。また、Wntシグナル伝達経路が関連する各種疾患に対し新たな治療方法を提供するものと期待される。本開発化合物は2011年4月にエーザイ株式会社に癌分野での研究開発権をライセンスアウトした。現在、PRI-724の臨床試験は順調に推移しており、今後の大きく期待される。

PRI-724はWntシグナル伝達経路に存在するCBP/ β -カテニン複合体の形成を選択的に阻害する低分子化合物である。一般的に、Wntシグナル系のような生命の根幹にかかわるシグナル伝達系を阻害した場合、非常

に重篤な毒性が発現すると考えられる。実際、これまでの Wnt 阻害剤はその毒性によって開発が頓挫してきた。しかしながら PRI-724 の毒性は低く、開発上大きな問題とはならなかった。その理由は、PRI-724 の CBP/ β -カテニン複合体形成の阻害メカニズムにあると考えられる。

PRI-724 はその結合メカニズム解析から CBP の N 末端領域に結合し、CBP と β -カテニンとの結合を阻害することが明らかになっている。CBP の N 末端領域はアンストラクチャード、あるいはディスオーダードメインと呼ばれる天然変性構造領域である。PRI-724 はこの天然変性構造領域に特異的に結合し、その薬理活性を発現していると推定している。CBP は種々の蛋白質と相互作用するが、各ドメインごとに相互作用する蛋白質が異なっており、N 末端の作用のみ阻害することにより、副作用が大きく軽減されたと考えられる。すなわち、遺伝子ノックアウトや siRNA、受容体抗体などは、シグナルを完全に遮断してしまうため、重篤な副作用を引き起こすが、PRI-724 のような化合物は蛋白質の機能をドメイン特異的に阻害することができるという点で、既存の阻害剤とは大きく異なっている。

幸運なことに、PRI-724 は CBP/ β -カテニン複合体の形成を選択的に阻害することによって、P300/ β -カテニン複合体の形成を促進し、細胞のシグナルを増殖から分化に切り替える機能を持っていた。これによって、低毒性で各種癌細胞株に対して細胞増殖抑制と分化促進作用を示す新規抗癌剤の開発が可能となった。

生体内における不規則構造領域の役割に関する研究は始まったばかりであり、まだまだ不明な点も多いが、一つの重要な示唆として p53 の例⁴が挙げられる。p53 は細胞内で 1900 もの蛋白質と相互作用することが明らかにされており、これらの蛋白質との結合は p53 アミノ酸配列のわずか 29% に相当する不規則構造領域で主に行われている。従って、一つの蛋白質が複数の蛋白質と相互作用する場合に、この不規則領域が重要な役割を担っていると考えられる。また、不規則構造領域を持つ蛋白質は糖尿病や癌、あるいは心血管病に関与する多くの蛋白質にみられ⁵、さらにはバイオインフォマティクスによる解析から癌関連蛋白質の 79% がこの不規則領域を持つと推定されている⁶。しかしながら、このような不規則領域を創薬ターゲットとするような研究開発は行われておらず、PRISM 社によるアプローチが初の試み

である。

PPI 阻害剤創出を目標とした化合物ライブラリーの構築

PRISM 社は、PRI-724 創出の過程において、構造的多様性に富んだ独自の α -ヘリックス模倣化合物群を創出し、3 件の国際特許を出願済みである。PRISM 社では、これら α -ヘリックス模倣化合物を用いて、PPI 阻害剤創出を目的とした自社ライブラリー (PRISM Library) を構築している。PRISM Library は現在、約 5,000 化合物から構成されており、今後さらに拡張してゆく予定である。

PRISM 社が創出した α -ヘリックス模倣化合物群と α -ヘリックス構造領域との重なりを、蛋白質における ϕ 、 ψ の二面角をプロットした Ramachandran プロット上に配置した結果を図 2 に示した。 α -ヘリックス模倣化合物群の Ramachandran プロット上での表現は、図 1 で示した RMSD 値が 0.9 Å 以下の蛋白質構造上に配置することにより実施した。

PRISM 社の α -ヘリックス模倣化合物群が天然の蛋白質における α -ヘリックス構造領域全体をカバーしており、理想的な α -ヘリックス模倣化合物群として機能す

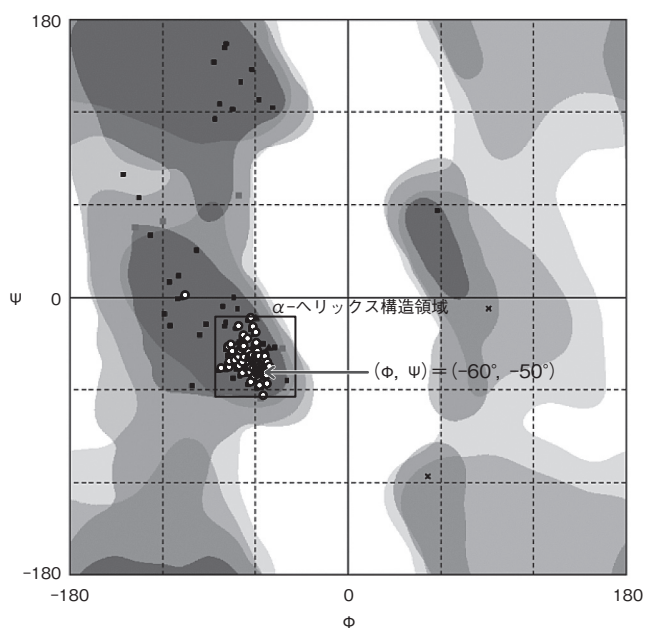


図 2 α -ヘリックス構造領域と α -ヘリックス模倣化合物群の適用領域の比較
 ■, × : ヘモグロビン (PDB:1GZX)、○ : α -ヘリックス模倣化合物群、Ramachandran プロットは RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) で作成した。

essay

ることがご理解いただけるであろう。

弊社ではPRISM LibraryのコンセプトであるPPI阻害剤探索の可能性を検証するため、自社内で抗癌剤、抗炎症剤、自己免疫疾患治療剤を目指した各創薬ターゲットに対する活性評価を行った。その結果、各ターゲットに対して特異的阻害活性を持つ化合物を取得した。平均ヒット率は0.2～0.5%、ヒット化合物のIC₅₀値は100 nM～10 μMオーダーであった。

以上のことから、著者らはPRISM libraryを用いることによって、これまでハードルが高すぎるために創薬ターゲットして考えられていなかったPPIを阻害するヒット化合物を取得できると確信している。PRISM社では、現在、大手製薬会社とPRISM Libraryを用いた共同研究を推進中である。

英文タイトル：Drug Discovery for Protein-Protein Interaction Modulator.

References

- 1) Stites, W. E. *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1233-50
- 2) Brooijmans, N.; Sharp, K. A.; Kuntz, I. D. *Proteins*, 2002, 48, 645-53
- 3) Tsai, C. J.; Xu, D.; Nussinov, R. *Protein Sci.* 1997, 6, 1793-805
- 4) Christopher, J. O. *BMC Genomics*, 2008, 9, 1
- 5) Everts, S. *Chemical & Engineering news*, 2007, 85, 14
- 6) Charles, A. G. *J. Proteome Res.*, 2006, 5, 2839

