薬剤耐性変異を獲得したタンパク質の不可逆阻害に成功

―不可逆阻害剤開発のための新たな分子デザイン―

概要

京都大学大学院工学研究科の浜地 格 教授、田村 朋則 講師、河野 正晴 博士課程学生らの研究グループは、同研究科の松田 建児 教授、東口 顕士 講師との共同研究により、タンパク質不可逆阻害のための新たな反応基を開発し、これが薬剤耐性変異を獲得したタンパク質の機能阻害に有効であることを実証しました。

化学反応によって「標的タンパク質に一度くっついたら離れない」不可逆阻害剤は、強力な薬効が期待できるため近年の創薬研究において大きく注目されています。一方、現在臨床で用いられている不可逆阻害剤の多くはタンパク質中のシステイン(1)残基としか反応しないため、システインが別のアミノ酸に変異した薬剤耐性タンパク質には効果がなくなってしまうという課題がありました。こうした中、本研究グループは *N*-アシル-*N*-アリールスルホンアミド（ArNASA）基がリジン(2)残基と反応可能であり、なおかつ血清含有培地などの生理的環境においても高い安定性を示すことを見出しました。さらにこの反応特性を活用し、薬剤耐性変異を有するブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）(3)に対する世界初の不可逆阻害剤の開発に成功しました。

本成果は、2023 年 11 月 21 日に米国の国際学術誌「*Journal of the American Chemical Society*」にオンライン掲載されました。

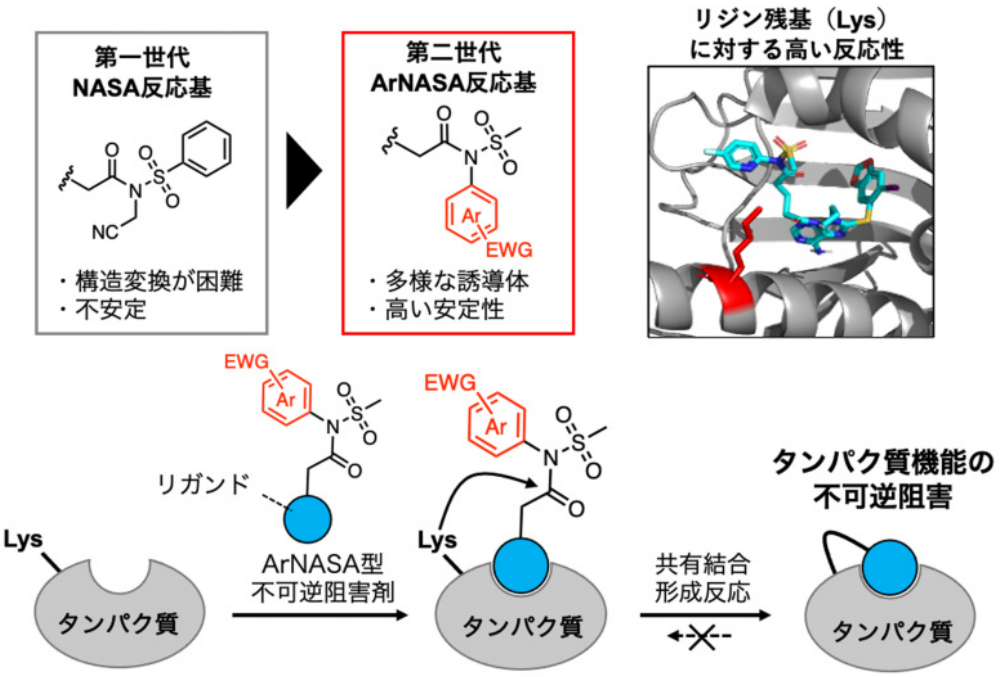

図１　開発した ArNASA 反応基の構造とタンパク質不可逆阻害のスキーム

１．背景

近年、がんに対する低分子医薬品の設計戦略として不可逆阻害剤が注目を集めています。不可逆阻害剤は、標的タンパク質に特異的に結合する部分（リガンド）と、タンパク質上のアミノ酸残基と反応するための反応基から構成されています（図 2a)。いったん不可逆阻害剤が標的タンパク質に認識されると、反応基がタンパク質上のアミノ酸と化学反応して共有結合を形成します。すると、この阻害剤は結合部位から二度と外れなくなり、タンパク質の活性を不可逆的に阻害します。こうした作用機序によって、不可逆阻害剤は一般的な可逆的阻害剤と比較して強力かつ持続的な薬効を示すという利点があります。これまでに医薬品として承認されている不可逆阻害剤の多くは、反応基としてα,β-不飽和カルボニル基を有しています（図 2b)。この反応基はタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸の中で最も反応性が高いシステイン残基と選択的に反応することができ、生体内での安定性が高いという特長があります。一方、システインはタンパク質中における存在比率が低く（~2.3%)、リガンド結合部位の近くにシステイン残基を持たない大多数のタンパク質には適用できないといった問題がありました。さらに最近の研究から、いくつかのがん関連タンパク質は、不可逆阻害剤の標的となるシステインが別のアミノ酸に変異することによって、薬剤耐性を獲得することが明らかになっています。こうした背景から、システイン以外のアミノ酸を標的可能な不可逆阻害剤が強く望まれています。

こうした中、本研究グループは以前、*N*-アシル-*N*-アルキルスルホンアミド(NASA)基が不可逆阻害剤の反応基に利用可能であり、側鎖にアミノ基を有するリジン残基と効率的に反応することを見いだしました(*Nature Communications,* 9, 1870, (2018))（図 2 c)。ところが NASA 型不可逆阻害剤は、生理的条件下での安定性が低く血清含有培地中で容易に失活してしまうという課題がありました。この課題を克服するためには、NASA 基の構造最適化が必要ですが、NASA 基は誘導体を合成するのが難しく、構造-活性相関研究が十分に行われていないのが現状でした。

２．研究手法・成果

そこで本研究グループは簡便な合成プロセスで多様な構造を創出可能な新規 NASA 骨格として、*N*-アシル-*N*-アリールスルホンアミド（ArNASA）を考案しました(図 2c)。ArNASA 骨格は市販の芳香族アミンを出発原料として容易に合成でき、芳香環上の置換基を変えることで様々な立体構造や電子状態を有する誘導体ライブラリーを構築可能です。本研究では図 3 に示す 13 種類の ArNASA 基を合成し、水中での加水分解に対する安定性を評価しました。その結果、各 ArNASA 誘導体は従来の NASA よりも半減期が長く、水中安定性が向上していることがわかりました。また、反応基の加水分解速度は密度汎関数理論（DFT）計算から推定される反応性と概ね相関することがわかりました。これは、ArNASA 基の反応性は計算によって予測可能であることを意味しており、この知見はコンピューター上で反応基の最適構造を検討するヴァーチャルスクリーニングに役立つと期待されます。

次に、熱ショックタンパク質 90（HSP90）[(4)]を標的とした ArNASA 型 HSP90 不可逆阻害剤を合成し、試験管内にて ArNASA 基のタンパク質に対する反応速度を評価しました(図 4a)。その結果、興味深いことに、いくつかの ArNASA 基（i, k, l）は従来の NASA 基よりも本質的な反応性が低いのにもかかわらず、より迅速かつ効率的に HSP90 と反応することがわかりました(図 4b)。この理由についてより詳細に考察するためにドッキングシミュレーション[(5)]を行ったところ、ArNASA 基に導入したピリジン[(6)]環上の窒素原子が HSP90 の反応点であるリジン残基と水素結合[(7)]を形成することで反応基とリジン残基がより強固に近接し、反応が加速されることが示唆されました(図 4c)。以上の結果から、反応性が低い反応基であっても、近接効果を最大化することで効率的な不可逆阻害が可能であることを実証しました。

HSP90 は他のタンパク質の立体構造形成（フォールディング）を促進する分子シャペロンであり、その活性ががん細胞の生存・増殖に必須であるため、近年有望な創薬ターゲットとして注目を集めています。そこで、本研究で開発した ArNASA 型 HSP90 不可逆阻害剤をがん細胞に作用させたところ、これらは通常の可逆的阻害剤と比較して強い増殖阻害活性を示しました。また、血清存在下では従来の NASA 型不可逆阻害剤は分解による失活のため顕著に阻害活性が低下するのに対して、ArNASA 型阻害剤は血清中であっても阻害活性は維持されており生体適合性が改善されていることが示されました。

最後に、本研究グループは薬剤耐性変異を獲得したタンパク質の不可逆阻害に ArNASA 基を適用しました。ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）は、慢性リンパ性白血病などの血液がんの重要な治療標的として知られており、これらの疾患の治療薬として BTK 不可逆阻害剤イブルチニブが臨床で広く使用されています(図 2b)。イブルチニブは反応基としてα,β-不飽和カルボニル基をもつ低分子医薬であり、BTK の 481 番目のシステインと反応して共有結合を形成するように設計されています。ところが近年、このシステインがセリンに置き換わる C481S 変異によって BTK がイブルチニブ耐性を獲得することが発見されました。実際、イブルチニブ耐性患者では BTK-C481S 変異が高頻度に見出されており、この変異に対する新しい治療法の開発が求められています。そこで本研究グループはイブルチニブを母骨格として反応基を ArNASA に置き換えた ArNASA 型 BTK 阻害剤を合成し、その阻害活性を調べました(図 5a)。その結果、ArNASA 型阻害剤は野生型 BTK や BTK-C481S 変異体の 430 番目のリジン残基と反応することで不可逆的に結合することができ(図 5b)、従来のイブルチニブよりも BTK-C481S 変異体を強く阻害できることが明らかとなりました。本研究は BTK-C481S 変異体の不可逆阻害が可能であることを示した世界初の例であり、薬剤耐性タンパク質に対する治療薬開発への道を拓く画期的な成果です。

３．波及効果、今後の予定

本研究から ArNASA 基は、(1) 多様な構造・反応性を有する誘導体ライブラリーを構築することが容易で、(2)リジン残基と効率的に反応することができ、(3) 生理的環境においても安定性が高く、(4)従来のシステイン標的型不可逆阻害剤に耐性を獲得した変異型タンパク質に対しても有効であることが実証されました。本研究で示したように、反応基とアミノ酸残基との近接効果は有効な不可逆阻害剤開発において極めて重要であり、ArNASA 基の構造多様性は標的タンパク質に最もフィットする反応基を特定するのに有用であると期待されます。システイン型不可逆阻害剤に対する薬剤耐性は本研究で取り扱った BTK 以外にも、がんの重要な治療標的である EGFR（上皮性増殖因子受容体）をはじめ複数報告されています。これらのタンパク質についても、多くの場合薬剤結合部位近傍にリジン残基が存在するため、ArNASA 基は薬剤耐性タンパク質に対する新規治療薬開発のための一般性の高い戦略として創薬研究を加速することが期待されます。現時点では ArNASA 基の適用は培養細胞を用いた検証実験にとどまっていますが、今後は生体適合性をさらに改善し、マウスなどの生物個体内さらにはヒトにも応用可能な反応基の開発に取り組みたいと考えています。

４．研究プロジェクトについて

●科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 総括実施型（ERATO）
研究領域：「浜地ニューロ分子技術」（研究総括：浜地　格　京都大学　教授）（課題番号 JPMJER1802）
●文部科学省科学研究費助成事業　特別推進研究
研究課題名：「生体分子夾雑の有機化学の開拓」（研究代表者：浜地　格　京都大学　教授）（課題番号 23H05405）
●文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究

研究領域：「分子夾雑の生命化学」
研究課題名：「分子夾雑下での生命分子の直接修飾/機能解析を実現する有機化学」（研究代表者：浜地　格　京都大学　教授）（課題番号 17H06348）
●文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究
研究領域：「「生命金属科学」分野の創成による生体内金属動態の統合的研究」
研究課題名：「生命金属動態の理解に向けた金属イオン Conditional プロテオミクス法の開発」（研究代表者：田村　朋則　京都大学　講師）（課題番号 19H05764）
●文部科学省科学研究費助成事業 基盤研究（B）
研究課題名：「オルガネラ代謝物の化学標識による時空間メタボローム解析」（研究代表者：田村　朋則　京都大学　講師）（課題番号 21H02058）
● JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェローシップ創設事業 JPMJFS2123

＜用語解説＞

1. システイン：タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のひとつ。側鎖に高反応性のチオール基を有する。
2. リジン：タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のひとつ。側鎖にアミノ基を有する。
3. ブルトン型チロシンキナーゼ：タンパク質のリン酸化を触媒する酵素のひとつで、リンパ球の成熟に重要な役割を果たす。
4. 熱ショックタンパク質 90：細胞が熱や化学物質などのストレスにさらされた際に発現が上昇して細胞を保護するタンパク質の一種。
5. ドッキングシミュレーション：低分子-タンパク質複合体の安定構造をコンピュータ上で計算的に推定する手法。
6. ピリジン：複素環式芳香族化合物のアミンの一種であり、ベンゼンに含まれる 6 つの C－H 構造のうち 1 つが窒素原子に置き換わった構造をもつ。
7. 水素結合：電気陰性度が大きな原子に共有結合で結びついた水素原子が、近傍に位置した窒素、酸素、硫黄、フッ素などの孤立電子対とつくる非共有結合性の引力的相互作用。

＜研究者のコメント＞

当初は従来用いられてきた NASA 基を使って BTK に対する不可逆阻害剤開発を行っていたのですが、構造をマイナーチェンジしても阻害活性がほぼ無く、非常に難航していました。思い悩む中、ふと今回の ArNASA 骨格を思いつき試してみたところ、BTK に対して高い阻害活性を持つ化合物が得られ、研究の成功を確信したのを覚えています。本成果によってリジン標的型反応基の選択肢が大きく広がったと同時に、生物個体への応用にも大きく近づいたと考えています（河野正晴）。

＜論文タイトルと著者＞

タイトル：Lysine-reactive *N*-acyl-*N*-aryl sulfonamide warheads: Improved reaction properties and application in the covalent inhibition of an ibrutinib-resistant BTK mutant（和訳）リジン反応性 *N*-アシル-*N*-アリールスルホンアミド反応基：改善した反応特性とイブルチニブ耐性 BTK 変異体の不可逆阻害への応用

著　　者：河野正晴、村川駿介、東口顕士、松田 建児、田村朋則、浜地格

掲 載 誌：*Journal of the American Chemical Society*　DOI：https://doi.org/10.1021/jacs.3c08740

＜参考図表＞

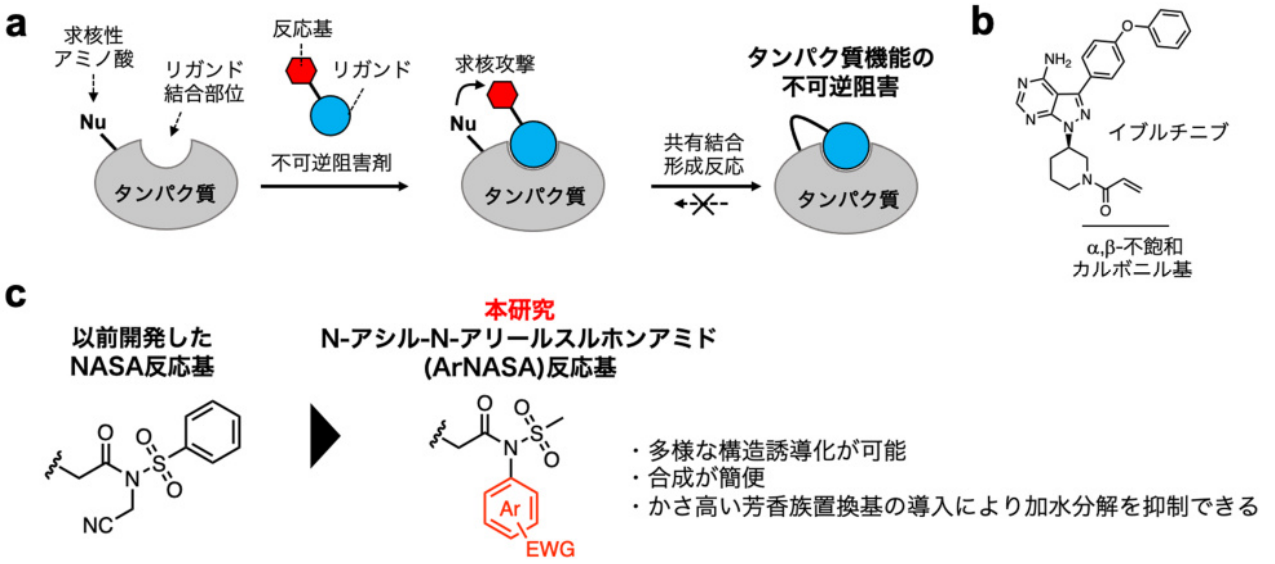

図２（a)不可逆阻害反応のメカニズム（b）代表的なシステイン標的型不可逆阻害剤（BTK 不可逆阻害剤：イブルチニブ）の分子構造（c)NASA 反応基と ArNASA 反応基の分子構造

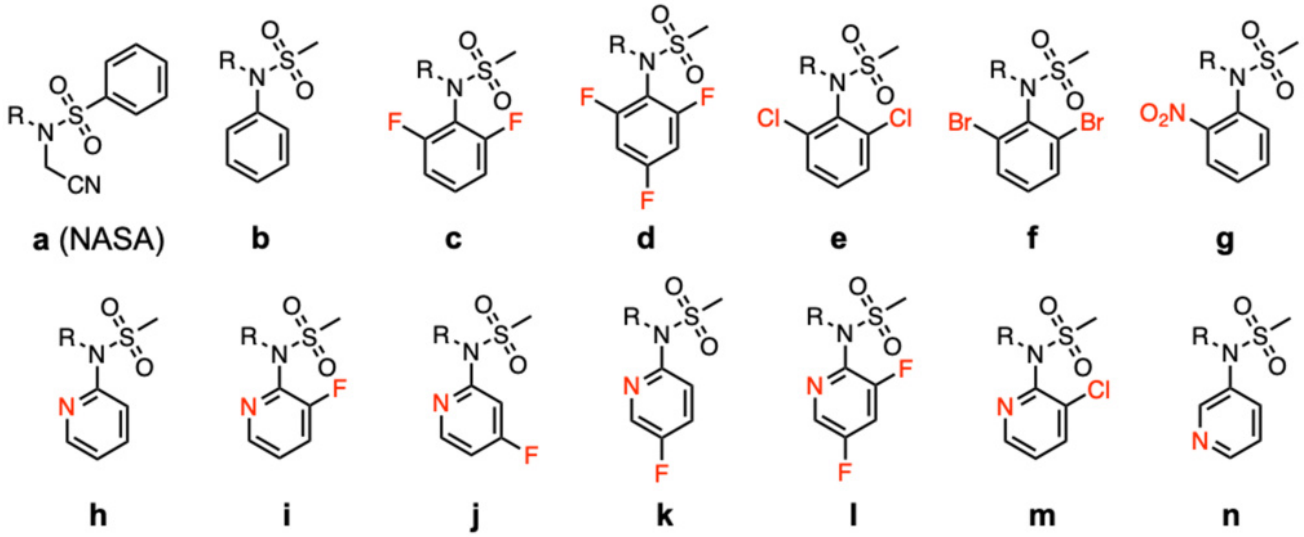

図 3 今回評価した 13 種の ArNASA 反応基(b–n)の分子構造（R はリガンドまたは検出用プローブ）

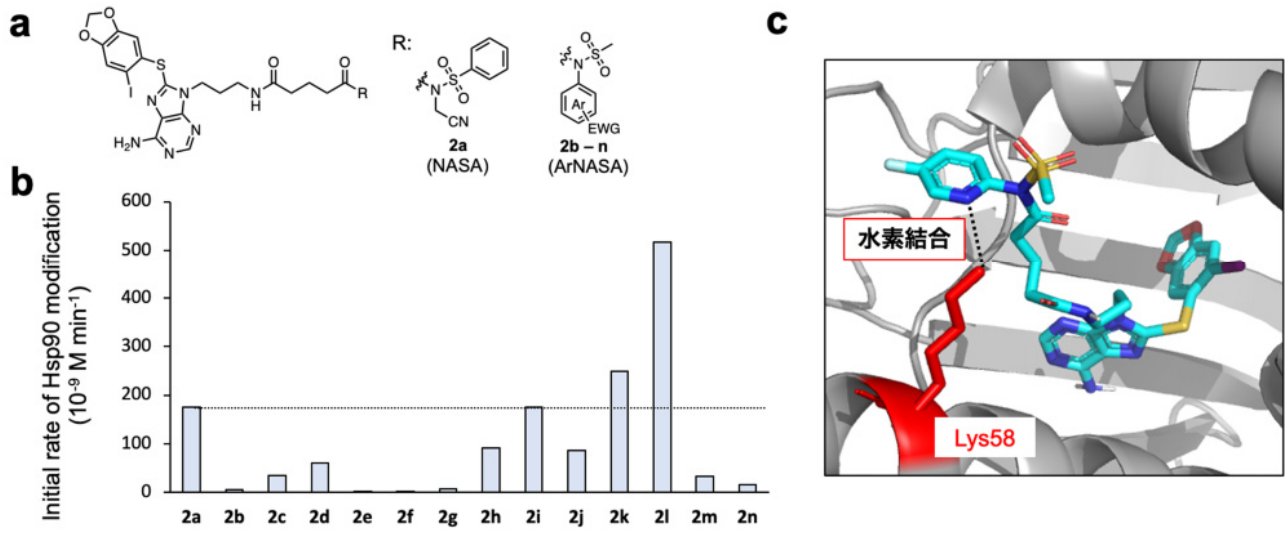

図 4 (a)HSP90 不可逆阻害剤の分子構造（b)HSP90 不可逆阻害反応速度の比較（c)HSP90 のリガンド結合ドメインと 2k のドッキングシミュレーション

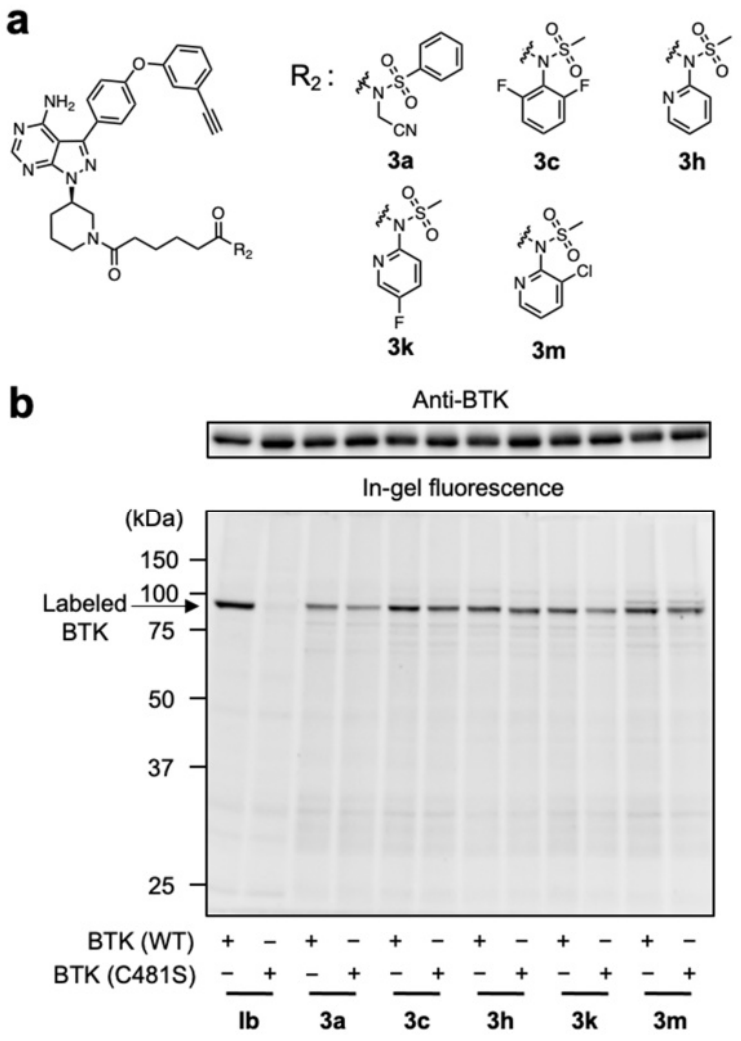

図 5 (a)BTK 不可逆阻害剤の分子構造（b)共有結合活性の評価。従来のイブルチニブ（Ib）は BTK-C481S 変異体に対する共有結合活性を持たないのに対して、NASA および ArNASA 型不可逆阻害剤は変異体であっても共有結合を形成できる。