

## 90. 速度論的制御に基づく癌関連接着因子阻害剤の開発

妹尾 暁暢

\*九州大学 大学院薬学研究院 グローバルヘルスケア分野

Key words : 蛋白質-蛋白質間相互作用, カドヘリン, 低分子化合物, 表面プラズモン共鳴法

### 緒言

癌治療における 5 年生存率を向上させるには、癌細胞そのものを死滅させるのみならず、癌の浸潤や転移を阻害する医薬品の開発が極めて重要である。P-カドヘリンは、膵臓癌や肺癌等の難治性の癌を始めとする多くの癌細胞で高発現し、癌細胞の転移能を司る重要な創薬標的である。P-カドヘリンは通常細胞にはほぼ発現せず癌細胞特異的に発現するため、その接着阻害により通常組織へ影響なく転移先での癌細胞増殖を阻害できる。そのため、P-カドヘリンの接着阻害は浸潤・転移阻害という観点から有効な抗癌戦略と位置づけられている [1, 2]。癌の転移は、P-カドヘリンの細胞外ドメイン (Extracellular domain 1-2 : EC12) のホモ二量体化に伴う細胞接着によって引き起こされる。ホモ二量体形成過程において、接着能のない不活性中間体である X ダイマーを経て、接着能を発揮する strand-swap ダイマーを形成する 2 段階のステップを経ることも分かっている (図 1) [3]。

目下、カドヘリンの細胞接着に対する低分子阻害剤開発における障壁は次の 2 点である。

- (1) P-カドヘリンモノマー表面に低分子化合物が高親和性で結合できる明確なポケット構造がない
- (2) P-カドヘリンホモ二量体(X ダイマー・strand-swap ダイマー)が持つ相互作用界面の面積はとても広く (低分子の約 10 倍)、低分子によってダイマー形成を阻害しきれない

以上の背景のため、ホモ二量体を競合的に遮断しようとする低分子阻害剤の開発は奏功しておらず、細胞接着を阻害する低分子の開発には、発想の転換が必要である。最近申請者は、この中間体の X ダイマーの相互作用界面には、モノマータンパク質には見られない明確なポケットが存在することを見出した [4]。このポケットを標的とすることで、高い親和性で中間体 X ダイマーに結合する化合物の取得が期待される。さらに、中間体 X ダイマーに安定的に結合する、すなわち X ダイマーとの滞留時間が長い化合物を選択することによって、strand-swap ダイマーへの遷移を阻害できるのではないかという着想に至った (図 2)。本研究はこのような相互作用の速度論に着目した化合物選抜を実施し、その細胞接着への効果を検証するものである。

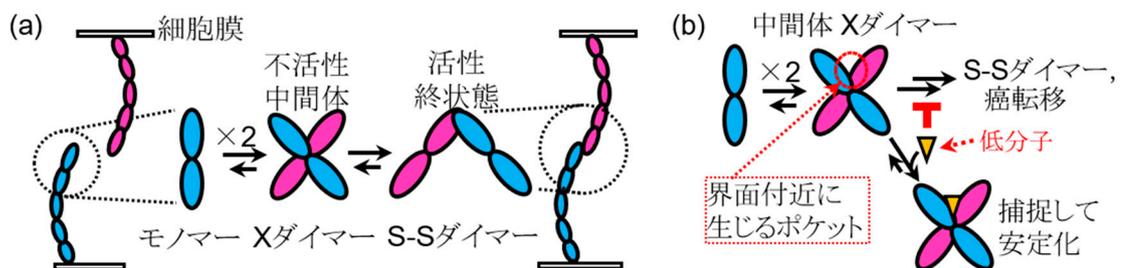


図 1. P-カドヘリンの細胞接着機構と本研究で目指す阻害機構

- a) P-カドヘリンによる細胞接着形成機構。
- b) 本研究で目指す細胞接着阻害メカニズム。中間体である X ダイマー特有の明確なポケットに対し高い親和性で結合する化合物の取得を目指す。中間体の安定化によって終状態である strand-swap ダイマーへ遷移するのを阻害する。

\*現在の所属：九州大学 大学院薬学研究院 蛋白質創薬学分野

## 方法

### 1. スクリーニングに使用する組換えタンパク質の調製

カドヘリンのホモ二量体化は細胞外ドメインの EC12 中間体 X ダイマー特有のポケットに結合する化合物をスクリーニングするため、Xダイマーのみを形成し、Strand-swap ダイマーを形成しない変異型 EC12(Met-EC12)を大腸菌発現系により調製した。SPR による固定化方法として、biotin-SA capture 法を利用する予定であったため、C 末端に Avi-tag を付加したコンストラクトを使用した。タグ精製による粗精製の後、サイズ排除クロマトグラフィによって最終精製を行った。EC12 に対してさらに変異導入を行う際には、部位特異的変異導入 (KOD plus mutagenesis kit、タカラ) によって実施した。

### 2. 表面プラズモン共鳴法 (SPR)

中間体 X ダイマーのみを形成する変異体 Met-EC12 は、モノマーとホモ二量体の間の平衡状態にあるため、標的とするポケットが常に形成されているわけではない。ポケットを維持した状態で化合物スクリーニングを実施するため、モノマーへと解離せず、X ダイマーの状態を維持できる変異体 Met-EC12 S201C を使用した。SPR はセンサー基盤に固定したタンパク質と流路を介して基盤へ添加される評価対象分子の相互作用を検出する手法である。本研究では、Met-EC12 S201C 変異体を Sensor Chip NA (Cytiva) に固定化し、九州大学薬学研究院が提供している FDA 承認薬ライブラリーに含まれている化合物との相互作用を評価した。装置は、Biacore8K (Cytiva) を使用した。

### 3. P-カドヘリン発現細胞を用いた評価

SPR によるスクリーニングによって取得された化合物の細胞接着に対する効果をまずは簡易的に検証するために、P-カドヘリンを内在的に発現しているヒト大腸癌由来細胞 HCT116 を使用した。HCT116 における P-カドヘリンの発現は、P-cadherin (12H6) Mouse mAb (CST) を用いた免疫染色によって確認した。

## 結果および考察

### 1. 中間体 X ダイマーを安定化する変異体の探索

SPR を活用したスクリーニングにおいて、系中で常に中間体 X ダイマーのポケットを維持するために、Met-EC12 の相互作用界面付近のアミノ酸をシステインに変異させた。結晶構造 (PDB ID 4zmq) をもとに相互作用界面において近接する残基 (I7、D100、N102、G200、S201 の 5 つ) についてそれぞれシステインに変異させた 5 種の変異体を調製した。非還元条件下で SDS-PAGE を実施し、ダイマーの分子量にバンドが現れる程度によって X ダイマーを維持できているかを判断した (図 2)。

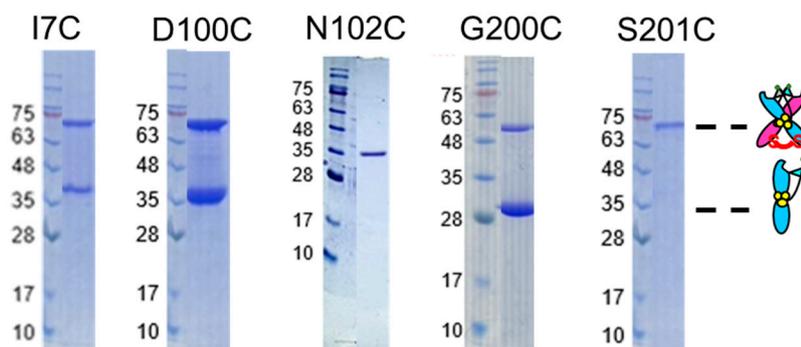


図 2. システイン変異体のダイマー形成実験の結果

各変異体を発現・精製し、非還元条件の SDS-PAGE によりダイマー維持能を評価した。

その結果、I7C、D100C、G200C の 3 変異体においてはモノマーとダイマーの比率がおよそ半分ずつ程度なのに対し、S201C 変異体においてはほとんどがダイマーを維持していることが分かった (図 2)。本結果より、Met-EC12 S201C を用いて SPR による化合物スクリーニングを実施することとした。

## 2. X ダイマーのポケットに対する低分子スクリーニング

### (1) 化合物スクリーニングとヒット化合物の選抜

1 によって見出した Met-EC12 S201C を SPR のセンサー基盤に biotin-SA capture 法によって固定化した。その結果、3000 RU ほどの固定化量となり、化合物スクリーニングの実施に問題ないレベルの固定化量を得ることができた。このセンサー基盤に対して、FDA 承認薬ライブラリーに含まれる化合物をひとつずつ添加していき、各化合物の結合レスポンスを測定した。本研究では、相互作用の速度論に着目した化合物選抜を行うため、化合物の X ダイマーからの解離速度が速い化合物、遅い化合物を含む 11 化合物をヒット化合物として選抜することができた。図 3 にライブラリー中に含まれていた各化合物の結合レスポンス値および、代表的な結合センサグラムを示す。ヒット化合物の選抜基準としては、Met-EC12 S201C の固定化量と分子量、およびライブラリー中に含まれる化合物の分子量をもとに想定される化合物由来の結合レスポンス値を計算し、その値から大きく逸れない化合物をヒット化合物とみなすことにした。

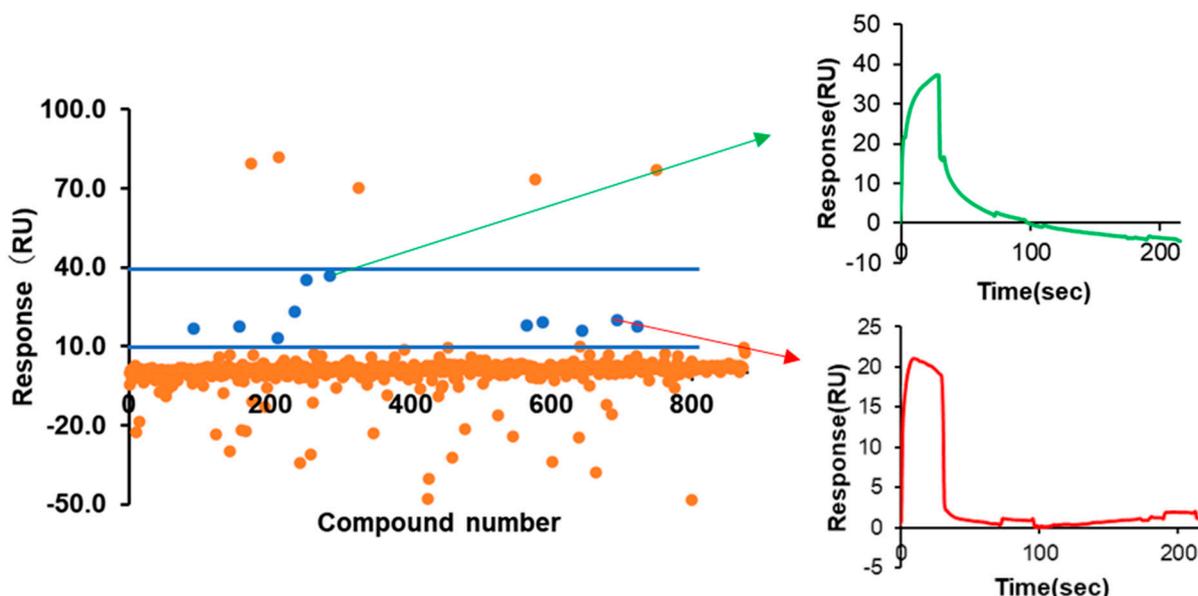


図 3. Met-EC12 S201C に対する化合物スクリーニングの結果

図中左側に各化合物の結合レスポンスを示す。青色の点で示した 11 化合物がヒット化合物とみなされた。オレンジ色の点で示した化合物は、ほとんど結合レスポンスがみられない、もしくは非特異的な結合と示唆される想定よりも高いレスポンス値を示した化合物である。図中右側には、代表的なヒット化合物のセンサグラムを示した。低分子化合物に特徴的な、速い解離速度を持つ化合物(赤)や、遅い解離速度を示す化合物(緑)も取得することができている。

### (2) ヒット化合物の濃度依存的結合試験

スクリーニングで得られたヒット化合物がどの程度の結合親和性で Met-EC12 S201C に結合しているのかを評価するため、濃度依存的な化合物結合試験を実施した。その結果、ヒット化合物としていた 11 化合物の内、4 化合物が濃度依存的な結合レスポンスを示した。Scatchard 法によって解離定数  $K_D$  を算出すると、 $10^{-6} \sim 10^{-4}$  M の  $K_D$  をもつ化合物が得られた (図 4)。中には、Xダイマーを組んでいる Met-EC12 S201C から

極めて遅い速度で解離する化合物も含まれており、この化合物はXダイマーの中間体を安定化能が他の化合物に比べて高いことが示唆された。

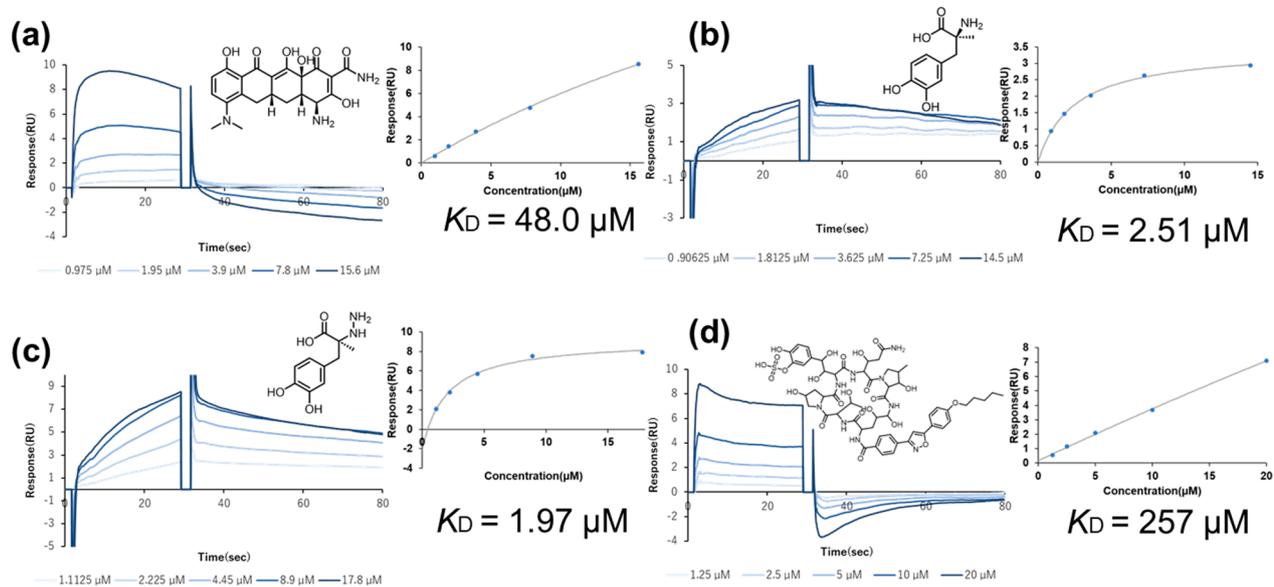


図 4. ヒット化合物の濃度依存的結合の確認と  $K_D$  の算出

濃度依存的結合が見られた 4 種の化合物 (a) ~ (d) について、結合レスポンスおよび Scatchard plot を示している。

これらの化合物は、依然 Met-EC12 S201C 変異体への結合能を評価したにすぎない。今後、Met-EC12 や EC12 への結合能も評価し、これらの化合物が実際に X ダイマーのみを認識する化合物かどうかを検証する予定である。特筆すべきは、今回のヒット化合物が示した  $K_D$  値は、これまで知られているカドヘリンに結合するいかなる低分子リガンドよりも強い親和性となっている点である。X ダイマー特有の明確なポケットを狙ったからこそ実現できる親和性であることが示唆された。今後、X 線結晶構造解析などによって化合物の最適化を行うことで nM オーダーに迫る低分子リガンドが取得されることが期待される。本研究ではその出発点と言える系の構築とヒット化合物の取得を行うことができた。

### 3. P-カドヘリン発現細胞を用いた評価

上記で得られた P-カドヘリンの X ダイマーに結合する化合物が細胞接着に対して影響を及ぼしうるかを評価するため、P-カドヘリンを内在的に発現する結腸癌由来細胞 HCT116 を用いた細胞増殖試験を行った。一般に、細胞は接着が阻害されるとコロニーを形成できなくなるため細胞の増殖ができなくなる。この性質を利用し、ヒット化合物添加時に細胞増殖が阻害されるかを検証した。細胞の増殖は Cell-counting Kit-8 (同仁化学) によって定量的に評価した。その結果、ヒット化合物 (図 4a) を添加した際に濃度依存的な細胞増殖阻害効果が観察された (図 5)。今後は、他の化合物の評価を進めると同時に、P-カドヘリンを siRNA によって排除した細胞等を用いたコントロール実験を進め、本化合物が確かに P-カドヘリンに作用することでこの作用がもたらされているかを検証する。

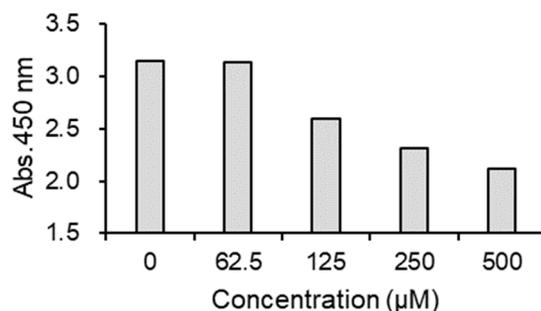


図 5. ヒット化合物の HCT116 増殖阻害

図 4 (a) の化合物を培地に添加した際に濃度依存的増殖阻害効果が見られた。

### 共同研究者・謝辞

本研究は九州大学大学院薬学研究院蛋白質創薬学分野において行われた研究である。サポートしてくださった研究室の皆様へ感謝申し上げます。最後に、本研究に対しご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文献

- 1) Frans van R, Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2014 Feb 14 (2):121-34. doi: 10.1038/nrc3647. Epub 2014 Jan 20. PMID: 24442140 DOI: 10.1038/nrc3647.
- 2) Vieira AF, Paredes J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015 Oct 6;14:178. doi: 10.1186/s12943-015-0448-4. PMID: 26438065; PMCID: PMC4595126.
- 3) Kudo S, Caaveiro JM, Tsumoto K. Adhesive Dimerization of Human P-Cadherin Catalyzed by a Chaperone-like Mechanism. *Structure*. 2016 Sep 6;24(9):1523-36. doi: 10.1016/j.str.2016.07.002. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27545624.
- 4) Senoo A, Ito S, Nagatoishi S, Saito Y, Ueno G, Kuroda D, Yoshida K, Tashima T, Kudo S, Sando S, Tsumoto K. Regulation of cadherin dimerization by chemical fragments as a trigger to inhibit cell adhesion. *Commun Biol*. 2021 Sep 7;4(1):1041. doi: 10.1038/s42003-021-02575-3. PMID: 34493804; PMCID: PMC8423723.