

|         |                                   |
|---------|-----------------------------------|
| 称号及び氏名  | 博士（理学） 北川 大輔                      |
| 学位授与の日付 | 平成 26 年 3 月 31 日                  |
| 論文名     | 抗がん薬開発を目的としたキナーゼ阻害剤プロファイリングパネルの構築 |
| 論文審査委員  | 主査 藤井 郁雄<br>副査 佐藤 孝哉<br>副査 多田 俊治  |

## 論文要旨

多くの薬剤は、特定の標的分子に結合し、その活性を制御することによって薬理活性を発揮する。従来の薬剤は開発段階では必ずしも標的分子が明らかではなかったが、近年の創薬研究では、疾患のメカニズムをあらかじめ分子レベルで解明し、疾患の原因とされる標的分子に作用する低分子化合物や抗体などを合理的に設計する、いわゆる分子標的アプローチを取ることが多い。特にがん治療薬の分野では、**BCR-ABL** 融合キナーゼの阻害薬であり、慢性骨髄性白血病の治療薬である **imatinib** の成功以来、各種がんの原因となる遺伝子の変異や活性の異常に関する研究の進展がめざましく、その産物であるタンパク質を標的とした分子標的薬も数多く開発されている。

がんの原因となる異常なタンパク質の多くはキナーゼである。ヒトのゲノムには **500** 種類を超えるプロテインキナーゼが存在することが知られている。キナーゼによるリン酸化の制御は、細胞内のシグナル伝達、細胞の成長や増殖、アポトーシスなど広範な場面で必須の役割を果たしており、リン酸化制御の異常は様々な疾患の原因となっている。キナーゼの異常な活性化による、増殖シグナルの過度なあるいは恒常的な活性化が、がんの原因となっていることが多く、これらのキナーゼを阻害することががんの縮退や死滅につながると考えられている。**Imatinib** 以降、同じく **BCR-ABL** の阻害薬である **dasatinib** や **nilotinib**、**Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)** の阻害薬である **erlotinib** や **lapatinib** など多くのキナーゼ阻害薬が認可・販売されてきたが、一方やはり **EGFR** の阻害薬である **gefitinib** のように、副作用により患者が死亡したとされる例もある。

キナーゼ阻害薬による副作用が生じる原因の一つとして、標的以外のキナーゼを意図せず阻害してしまうことが考えられる。ほとんどの低分子キナーゼ阻害薬は、キナーゼの **ATP** 結合部位に **ATP** と競合的に結合することによってキナーゼの活性を阻害する。ところが、キナーゼの **ATP** 結合部位の立体構造は互いに相同性が高いため、キナーゼ阻害薬は本来意図した標的以外のキナーゼも阻害してしまうことが多く、結果的に様々な副作用の原因になっていると考えられる。

このような事情により、キナーゼ阻害薬の開発過程を通して、阻害薬のキナーゼ全体(**キノム、kinome**)に対する特異性・選択性をモニターすることは極めて重要な意味を持つ。意図的に複数のキナーゼを阻害することにより強力な薬理効果を狙ったマルチキナーゼ阻害薬も存在するが、基本的に

は意図したキナーゼ以外の阻害は可能な限り排除することが副作用の小さい、すなわち有効濃度範囲の広い薬を作る最善の方法であると考えられる。

本研究では、疾患に関連した変異キナーゼを含む、**310** 種類のキナーゼから成るプロファイリングパネルを構築し、これを用いて実際にキナーゼ阻害薬 **9** 剤についてキナーゼ阻害プロファイルを調べた。第 **1** 章では、膜貫通受容体型のチロシンキナーゼである **Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R)** の **Mobility Shift Assay (MSA)** でのアッセイ系の開発と、これを用いた化合物の評価について述べる。第 **2** 章では、個々に開発されたキナーゼアッセイ系を用いた、大規模プロファイリングシステムの構築について述べる。第 **3** 章では、**1, 2** 章で構築されたプロファイリングパネルを用いて実施した **9** 化合物のキナーゼプロファイリングについて述べる。第 **4** 章では、表面プラズモン共鳴法(**Surface Plasmon resonance, SPR**)を用いた結合親和性試験について述べる。

## 第1章 CSF1R のアッセイ系開発:

**CSF1R(FMS, CD115)** とも呼ばれる)は **1** 回膜貫通型のチロシンキナーゼであり、**Colony stimulating factor 1(CSF1)** の生理的なレセプターとして知られている。マクロファージ、樹状細胞、破骨細胞といった単球系の細胞で多く発現しており、これらの細胞の生存・増殖・分化などに必須の役割を果たしている。**CSF1** に対する抗体や **CSF1R** の **siRNA** によって **xenograft** の増殖が抑制される例が知られており、**CSF1R** の阻害薬はがんなどの疾患の治療に役立つ可能性がある。本章では **MSA** をプラットフォームとして **CSF1R** のアッセイ系を開発し、これを用いて実際に化合物の評価を行った。昆虫細胞 **Sf21** に **CSF1R** の細胞内ドメインをコードしたバキュロウィルスに感染させ、キナーゼタンパク質を発現させた。タンパク質の精製後、**ATP** 存在下でのインキュベーションによる自己リン酸化(**ATP** 処理)又はフォスファターゼによる脱リン酸化処理により、高リン酸化・高活性型の **CSF1R** と、低リン酸化・低活性型の **CSF1R** をそれぞれ調製した。**Src** peptide を基質とした場合に **MSA** でシグナルの測定が可能で、これら **2** 種類の **CSF1R** の最適酵素濃度や **ATP** に対する **K<sub>m</sub>** 値を決定し、アッセイ条件を確立した。これらの系を用いて **8** 種類の化合物の **IC<sub>50</sub>** を測定したところ、**2** つの型を同程度に阻害する化合物(**PD173074, staurosporine, dasatinib, sorafenib**)と、低活性型をより強く阻害する化合物(**GW2580, pazopanib, sunitinib, imatinib**)が存在することが明らかになった。またこれら化合物のうち、**sunitinib** と **staurosporine** については **Biacore** による結合親和性の評価も行い、**MSA** と相関性のある結果が得られた。

## 第2章 大規模キナーゼパネルの構築

**CSF1R** の場合と同様に、**310** 種類のキナーゼについてアッセイ系を開発し、キナーゼプロファイリングパネルを構築した。**MSA** は **FITC** 標識した基質ペプチドを **ATP**・金属イオン存在下でキナーゼとインキュベーションすることによりキナーゼ反応を行い、反応液中のリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドをキャピラリー電気泳動での移動度(**Mobility**)の違いにより分離・定量し、リン酸化率を測定する手法である。マイクロプレートの各ウェルに化合物・基質 / **ATP mixture**・酵素溶液を順に添加するだけで化合物による阻害率の測定が可能で、洗浄などの手間のかかる操作が不要な、いわゆるホモジニアスな系であるため、分注機による大規模化・自動化・高速化が比較的容易に可能である。このためなるべく **MSA** での開発を優先して行った。それぞれのキナーゼについて、**ATP** に対する **K<sub>m</sub>** 値、または細胞内での濃度に近い一律

の濃度(1mM)の 2 種類の ATP 濃度で実験が出来るように系を開発した。低シグナルなどの理由によりMSA でアッセイ系が構築できなかったキナーゼについては、IMAP 法または ELISA 法でアッセイ系を構築した。

### 第3章 大規模キナーゼパネルを用いたキナーゼ阻害薬のプロファイリング

前述のように、キナーゼ阻害薬について多くのキナーゼに対する阻害様式を把握することは、副作用の少ない良い薬を作る上で必須と言える。ここではキナーゼ阻害薬 9 剤(imatinib, dasatinib, nilotinib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, sorafenib, sunitinib, pazopanib)について、310 種類のキナーゼに対する阻害率を測定し、1 uM の化合物による阻害率が 40%を超えたキナーゼ-化合物の組み合わせについて、化合物の 10 段階濃度希釈液を用いて IC<sub>50</sub> 値を測定した。これにより各化合物のキナーゼ阻害プロファイルの詳細に調べることができた。それぞれの薬剤で報告されている標準摂取量での血中濃度と IC<sub>50</sub> 値の比較の結果、imatinib や nilotinib は ABL キナーゼに対して、gefitinib, erlotinib, lapatinib は EGFR に対してとるように、それぞれの意図した標的キナーゼに対して選択的な阻害プロファイルを示すことが確認された。また、sunitinib や sorafenib は若干の心臓毒性があることが知られているが、これらの原因キナーゼと推定される、AMPK や VEGFR、PDGFR といったキナーゼに対する阻害プロファイルも、それぞれの心臓毒性の強さと相関する結果が得られた。以上のように化合物のキナーゼプロファイリングを行うことにより、薬効が期待される標的キナーゼに対する阻害効果に加えて、副作用の原因となり得る非標的キナーゼに対する阻害効果についても有益な情報が得られた。

### 第4章 シングルサイト特異的ビオチン化キナーゼを用いた SPR によるキナーゼ阻害薬の評価:

MSA などのキナーゼ活性の阻害を直接測定するタイプのアッセイと並んで、キナーゼへの結合親和性の強さを測定する生物物理学的な手法は、阻害薬の評価に非常に有用である。このような系を用いることにより、活性が低すぎて活性ベースの実験では阻害率が測定できないキナーゼについても化合物の評価が可能である上、SPR による測定は、結合親和性だけでなく、結合・解離の速度といった動的パラメータも同時に測定できる。がん治療薬のように長い持続効果が必要な薬剤の場合は、標的分子からの解離速度が遅いものが特に効果が高いと言われており、SPR による解離速度の測定は化合物の評価・選別をより多面的で実用的なものにできる。ただし SPR ではセンサーチップ表面へのキナーゼの固定化が必要であり、従来は固定化の条件の設定に苦労することが多かった。本研究では、従来の化学的なビオチン化ではなく、細胞内での酵素なビオチン化によって、シングルサイト特異的にビオチン化されたキナーゼを作成することにより固定化の問題を解決した。アビジンでコートされたセンサーチップと組み合わせることにより、キナーゼを同一の向きに、かつ立体構造を保ったままの条件で固定化することが可能となった。これらのキナーゼと SPR デバイスである ProteOn XPR36 とを組み合わせることで、簡便かつハイスループットに SPR アッセイを実施することができた。

以上のように、化合物のキナーゼ阻害プロファイルを大規模かつハイスループットで調べることが出来るアッセイ系を開発した。またこれを利用して、キナーゼ阻害薬 9 剤のキナーゼプロファイリング試験を実施し、妥当な結果が得られた。さらに SPR を用いた生物物理学的な手法により、プロファイリング試験の結果を確認し、動的パラメータについても情報を得ることができた。今後はこれらのアッセイ系を実際に使用することによって、有効な新薬の開発に貢献して行きたい。

主論文

- 1) **Characterization of kinase inhibitors using different phosphorylation states of colony stimulating factor-1 receptor tyrosine kinase**  
Daisuke Kitagawa, Masaki Gouda, Yasuyuki Kirii, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, Ikuo Fujii, Yugo Narumi, Kensaku Akita, and Koichi Yokota  
J Biochem; 151: 47-55 (2012).
  
- 2) **Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors**  
Daisuke Kitagawa, Koichi Yokota, Masaki Gouda, Yugo Narumi, Hiroshi Ohmoto, Eiji Nishiwaki, Kensaku Akita, and Yasuyuki Kirii  
Genes Cells; 18: 110-122 (2013).
  
- 3) **Quick Evaluation of Kinase Inhibitors by Surface Plasmon Resonance Using Single-Site Specifically Biotinylated Kinases**  
Daisuke Kitagawa, Masaki Gouda, and Yasuyuki Kirii  
J Biomol Screen; In press.

## 審査結果要旨

ヒトゲノムには **500** 種類以上のプロテインキナーゼが存在する。これらキナーゼによるリン酸化の制御は、細胞内の広範なシグナル伝達系で必須の役割を果たしており、その異常はがん等の疾患の原因となっている。慢性骨髄性白血病の治療薬である **imatinib** の成功以来、多くのキナーゼ阻害剤が抗がん薬候補として開発中である。キナーゼ阻害剤の多くは **ATP** 拮抗剤であるが、**ATP** 結合部位はキナーゼ間でよく似ており、標的以外のキナーゼの阻害による副作用が懸念されている。一方、抗がん薬として効果を発揮するために、複数キナーゼの同時阻害が望ましいと考えられるがん種も存在している。そこで、本学位論文では、抗がん薬候補の効果と副作用について必要な情報を得るために、**310** 種類のキナーゼについて阻害活性を測定できるアッセイ系の開発を行った。

第 1 章では、膜貫通受容体型のチロシンキナーゼである **Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R)** を用いて、**Mobility Shift Assay (MSA)** による触媒活性（リン酸化）のアッセイ系を開発した。本法を用い、高リン酸化型 **CSF1R** と低リン酸化型 **CSF1R** で **8** 種の阻害剤の **IC50** を測定したところ、両型を同程度に阻害する化合物と、低活性型をより強く阻害する化合物が存在することが明らかになった。第 2 章では、**CSF1R** の場合と同様に、**310** 種類のキナーゼについてアッセイ開発を行い、キナーゼプロファイリングパネルを構築した。第 3 章では、キナーゼ阻害薬 9 種 (**imatinib, dasatinib, nilotinib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, sorafenib, sunitinib, pazopanib**) について、**310** 種キナーゼに対する阻害率を測定した。さらに、**1 μM** の化合物による阻害率が **40%** を超えた化合物については、**IC50** 値を決定した。これにより各化合物のキナーゼ阻害プロファイルの詳細に調べることが可能になった。第 4 章では、表面プラズモン共鳴法 (**Surface Plasmon resonance, SPR**) を用いた結合親和性試験を行った。

以上のように、阻害剤のキナーゼ阻害プロファイルを大規模かつハイスループットで調べることのできるアッセイ系を開発した。キナーゼ阻害薬の開発において、阻害薬のキナーゼ全体 (キノム, **kinome**) に対する特異性・選択性をモニターすることは極めて重要な意味を持っており、本研究は、副作用の少ない抗がん剤開発に大いに貢献する。また、本人自身がキナーゼの大量調製、触媒活性試験、結合実験までのすべてを手がけており、申請者を博士 (理学) の学位に値する能力をもつものと判断する。