

学位論文内容要旨

学籍番号：DP-15101

氏名：酒匂 佑介

題目：

In silico フラグメントマッピング法による PD-1/PD-L1 低分子性阻害剤の探索

要旨：

【背景と目的】

PD-1/PD-L1 の Protein-Protein Interaction (PPI) を標的とした抗がん治療が近年脚光を浴びている。臨床現場において同 PPI を阻害するモノクローナル抗体によるがん免疫療法が、様々ながん種を抱えた患者に対して抗腫瘍（がん細胞の増殖・浸潤の抑制や減弱）や長期寛解の効果があることが認められている。一方、低分子化合物による PD-1/PD-L1 阻害剤の開発に関しては、抗体薬の開発状況と比べると大きな差があり、少数の阻害剤の報告例があるだけである。但し、抗体薬に勝る低分子化合物の利点として、製造コストが低く抑えられることや経口投与が望めること、また免疫原性の問題を排除できる可能性等が挙げられ、低分子化合物による PD-1/PD-L1 阻害剤の開発が注目されている。

このような背景の中、本研究では PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子化合物の探索を試みた。PPI 界面は、一般的に広くて浅い表面となっていることが多く、ファーマコフォアモデルの設定が難しいケースがある。PD-1/PD-L1 についても同様であり、高難度ターゲットとして区分できるが、後述の *in silico* フラグメントマッピング法を用いることで、PPI 界面におけるリガンドファーマコフォア仮説を立て、その情報に基づいて PD-1/PD-L1 の PPI 阻害剤を探索することにした。

【方法】

PD-1/PD-L1 の PPI 阻害剤を探索するために次の解析を行った。

① 探索ターゲット構造の選定

研究開始時に明らかにされていた X 線結晶構造を調査し、解析対象となる構造を選抜すると共にそのタンパク質構造の動的挙動を考慮するために分子動力学 (MD) シミュレーションによる構造サンプリングを実施。選抜した X 線結晶構造と MD サンプリング構造を探索ターゲット構造として選定した。

② *In silico* フラグメントマッピング

当研究室で開発された Canonical Subsite Fragment DataBase (CSFDB) および Fsubsite プログラムを用いて本解析を実施した。CSFDB は既知のタンパク質ーリガンド X 線結晶構造から抽出されたサブサイトーフラグメントペア群から構成されるデータベースである。一方、Fsubsite は CSFDB 内のサブサイトと類似しているサイトを標的タンパク質上で探索、そして類似サブサイトが存在していた場合にペアとなるフラグメントを CSFDB から取り出して標的タンパク質上に配置する、いわゆる知識ベースのフラグメントマッピング プログラムである。①の探索ターゲット構造について Fsubsite の解析対象となるマッピング表面を設定した後、*in silico* フラグメントマッピングを実施した。そして、マッピングされたフラグメント集団の優先順位付けとして、エネルギー極小化計算 (macromodel, Schrodinger 2015-2) および結合自由エネルギー (MM/GBSA) 計算を行い (prime_mmgbsa, Schrodinger 2015-2), MM/GBSA の値上位 20 個を代表フラグメントとして選抜した。

③ 3D feature query の構築と探索プロトコルの設定

3D feature query の構築 : Pharmacophore Editor (MOE 2012, CCG) を用いて、次に示す手順に従い 3D feature query を構築した。

手順Ⅰ：代表フラグメントをそれらの配置から集約し、個別のサイトに分類。

手順Ⅱ：分類された各サイトに属するフラグメントの脂溶性官能基が、すべて納まるような脂溶性 feature を各々配置。

手順Ⅲ：各フラグメントの極性官能基に対応する極性 feature を配置。この際、2.5Å 内の半径の球でまとめられる同種の feature を 1 つに集約。

手順Ⅳ：マッピング表面に属するアミノ酸の重原子に排除体積 feature を配置。

探索プロトコルの設定：探索プロトコルを次のように設定した。

設定Ⅰ：手順Ⅰのサイト分類の結果に基づき必須サイトと任意サイトを設定。

目視により中央にあるサイトを必須サイト、その他を任意サイトとした。

設定Ⅱ：必須サイトについては、脂溶性 feature と少なくとも 1 つの極性 feature を満たすことを条件に含めた。また任意サイトについてはいずれかの脂溶性 feature を 1 つ満たすことを条件に含めた。すなわち合計 3 点以上の feature を満たすものを後述の Virtual Screening (VS) におけるヒット化合物要件とした。

④ 3D pharmacophore-based VS

構築されたクエリーおよび探索プロトコルを用いて市販化合物を対象とした VS を実施した。多数化合物に対応するため多段階のスクリーニングを実施した。1 次スクリーニングとして OMEGA (version 2.4.6, OpenEye) により生成された立体配座集団を対象とした pharmacophore search (MOE 2012, CCG) を、2 次スクリーニングとしてドッキング (GOLD version5.2, CCDC) を行い、3D feature query の要件を満たしつつ、ドッキングスコア上位化合物を抽出した。さらに、3 次スクリーニングとして、抽出された化合物と探索ターゲット構造との複合体モデルを構築し、エネルギー極小化計算および結合自由エネルギー (MM/GBSA) の算出を行った。そして、MM/GBSA 値の上位化合物につ

いて構造クラスタリング (Cluster Molecule module, Pipeline Pilot 9.1) を実施すると共に購入可能性を調査し、候補化合物を選抜した。

⑤ 候補化合物の *in vitro* アッセイ

選抜した候補化合物を購入し、hPD-1/hPD-L1 の PPI 阻害能を *in vitro* 評価 (ELISA 法) により実施した (BPS Bioscience 社に委託)。

【結果】

① 探索ターゲット構造の選定

結晶構造の調査の結果、PPI 界面において窪みがみられる PD-1 を探索ターゲットとすることが望ましいと考え、human PD-1 である PDB ID: 3RRQ を探索ターゲット構造に選定することにした (hPD-1 結晶構造と呼称)。同構造は PPI を形成していない apo 体構造である。PPI 阻害剤探索の戦略として holo 体構造を用いることが有効な手段と考えられるが、本研究では *in silico* フラグメントマッピング手法の検証も兼ねて apo 体構造を用いることにした。また、hPD-1 結晶構造を用いた MD シミュレーションの結果、4つのサンプリング構造が得られ (MD_cluster1~4 と呼称)、計 5つを探索ターゲット構造として選定した。

② *In silico* フラグメントマッピング

解析の結果、各ターゲット構造に対して以下の数のフラグメントがマッピングされた。hPD-1 結晶構造：353 個、MD_cluster1：353 個、MD_cluster2：346 個、MD_cluster3：353 個、MD_cluster4：339 個。そして、フラグメントの優先順位付けを行った結果、図 1 に示す代表フラグメントが選抜された。

③ 3D feature query の構築と探索プロトコルの設定

②で選抜された代表フラグメントを基に図2に示す3D feature queryを構築した。そして探索プロトコルについても設定、図2において必須サイトを白色の枠で囲った。

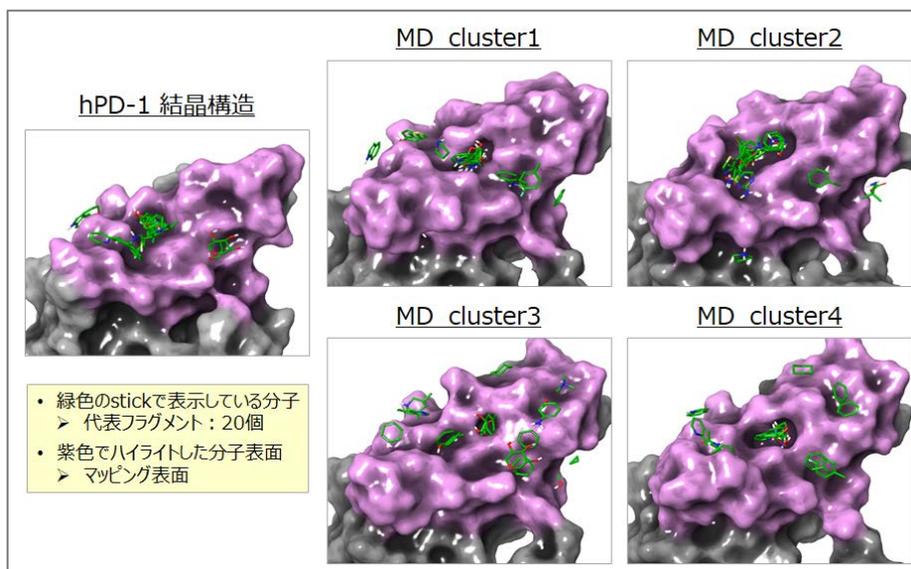


図1. 代表フラグメント

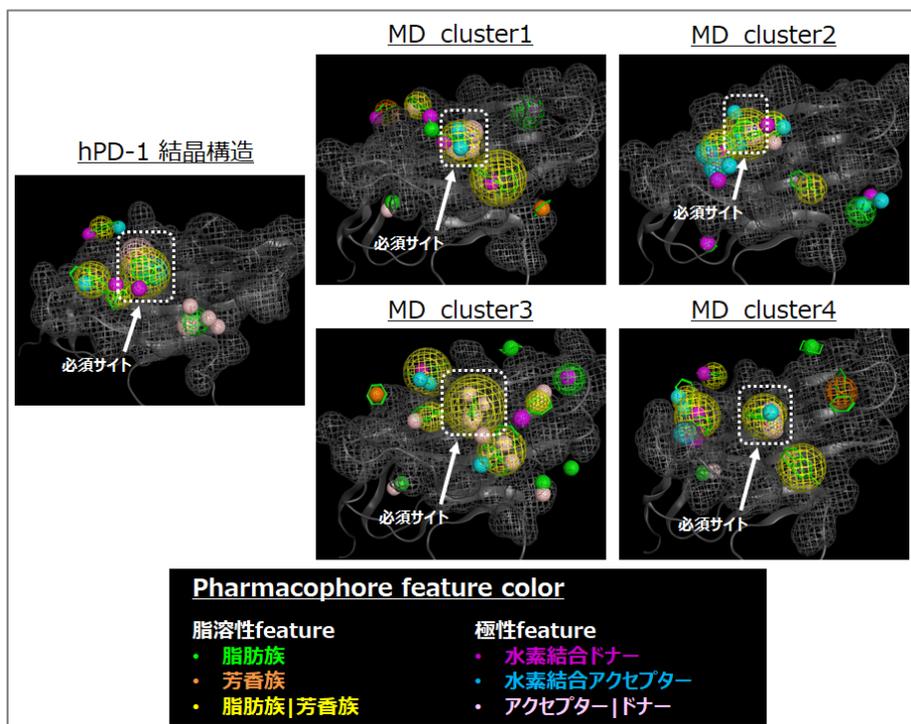
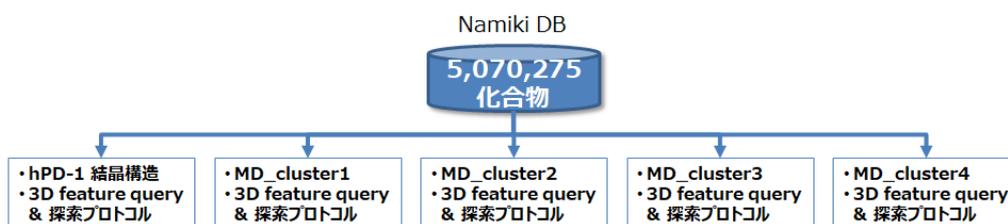


図2. 3D feature query

④ 3D pharmacophore-based VS

市販化合物（約 500 万化合物）を対象とした VS を実施した結果、各段階の VS ヒットとして図 3 に示す化合物が各々抽出された。そして、最終的に選ばれた計 25 個の候補化合物について *in vitro* アッセイを実施した。



各タンパク質構造と3D feature queryおよび探索プロトコルを用いて下記スクリーニングを実施。

1st screening : Pharmacophore search

- 立体配座集団を生成。Max200配座/化合物。
- 3D feature query探索プロトコルの条件を満たす化合物を抽出。

2nd screening : ドッキング

- 探索範囲：マッピング表面。
- Max10ポーズ/化合物。ChemScore：15以上。
- 3D feature query探索プロトコルの条件を満たす化合物を抽出。
(1化合物で複数ポーズが抽出された場合、ChemScoreが最大のポーズを選出)

3rd screening : 結合自由エネルギー解析

- 各ドッキングモデルのエネルギー極小化計算後に、結合自由エネルギー（MM/GBSA値）を算出。
- MM/GBSA：-40 kcal/mol 以下。

候補化合物の選抜

- 構造クラスタリング。
- 購入可能性の調査。
- 各構造クラスターから数個ずつMM/GBSAの解析値が上位且つ購入可能なものを**候補化合物**として選抜。

	hPD-1結晶構造	MD_cluster1	MD_cluster2	MD_cluster3	MD_cluster4
1st screening	2,223,057	2,227,594	2,226,154	2,229,913	2,238,633
2nd screening	2,397	3,923	5,871	53	1,580
3rd screening	37	170	147	3	91
候補化合物	8	3	3	0	11

数値：各段階のスクリーニング後のヒット化合物数を記載

図 3. 3D pharmacophore-based VS の結果

⑤ 候補化合物の *in vitro* アッセイ

アッセイの結果、compound 3 が化合物濃度 100 μ M で阻害率 21%の hPD-1/hPD-L1 PPI 阻害能を有することが確認された。同化合物は、hPD-1 結晶構造の 3D feature query を用いた VS から抽出された化合物である。hPD-1/compound 3 の複合体モデルを図 4 に示す。

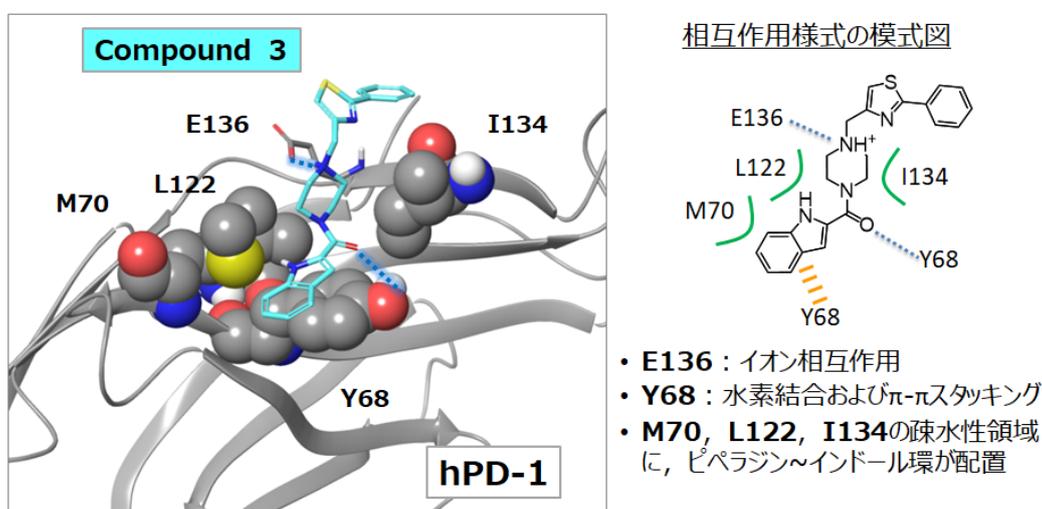


図 4. hPD-1/compound 3 複合体モデル

【考察】

hPD-1/hPD-L1 複合体構造 (4ZQK) が現在明らかにされているため、hPD-1 に対する hPD-L1 および compound 3 の相互作用様式の比較を行った。図 5 に示すように、4ZQK の構造において hPD-1 E136 に対して R113 がイオン相互作用を形成していたが、compound 3 についても hPD-1 E136 に対してピペラジン環内のカチオン化した窒素原子がイオン相互作用を形成していた。また、4ZQK の構造において hPD-L1 Y123 が hPD-1 のサブポケットを埋めているが、compound 3 についてもピペラジン~インドール環部分が同ポケットを埋める形

となっており，これら相互作用によって hPD-1/hPD-L1 の会合相互作用が阻害されている可能性が示唆された．本研究では holo 体の情報を使用していないが，上記のように，結果として key ファーマコフォアを検出するに至った．このことから *in silico* フラグメントマッピングの有用性が示せたものと考えられる．また，compound 3 の阻害活性は 21% と低活性であるが，図 6 に示すように compound 3 近傍においてフラグメントがマッピングされたサイト（Site 1，Site4，Site5）が見いだされているため，これらサイトを満たすように compound 3 をベースとした構造展開を図ることでポテンシャルのより高い化合物が創出されることが期待される．

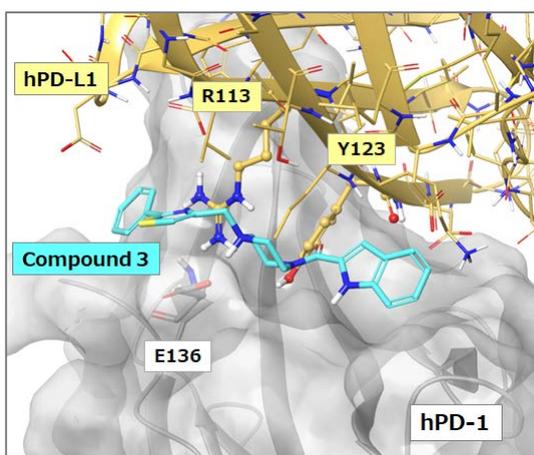


図 5. hPD-1 に対する hPD-L1 と compound 3 の相互作用様式比較

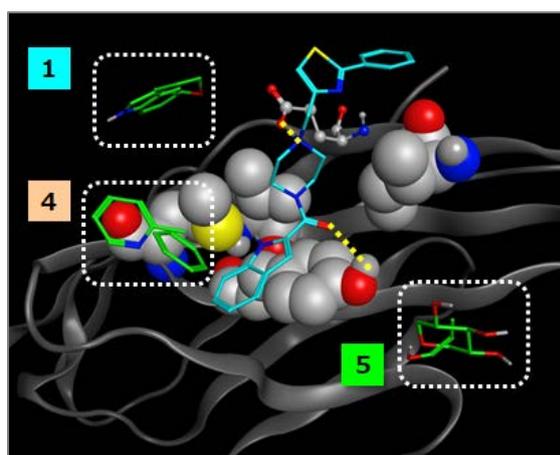


図 6. hPD-1/compound 3 複合体モデルと *in silico* フラグメントマッピングの比較