

制癌性2'-位置換デオキシシチジン類の作用基序の検討
—各種DNAポリメラーゼに対する阻害作用—

竹 貫 健 二

現在の癌治療において化学療法は重要な位置を占めている。その中で核酸関連代謝拮抗剤は、発癌性が少ない、代謝活性化を経て間接的に効果を発現するため、選択毒性が期待できる等の長所を有し、薬剤選択の際に優先度が高い。しかし固形腫瘍に効果を示すのは、5-Fluorouracil(5-FU)誘導体が大部分であり適用範囲が限られている。現在では各種制癌剤の併用療法が主流であるが、5-FUとは異なった制癌スペクトルを有する新しい核酸関連代謝拮抗物質の開発が強く望まれている。

一方Cytosine arabinoside(AraC)は、Deoxycytidineの糖部修飾アナログとして合成され、現在では抗急性白血病薬として臨床的に使用されている。しかしAraCは血清中のCytidine deaminaseにより不活性なUracil arabinosideに変換され、血中濃度を高く保ちにくい。また白血病細胞に強い増殖抑制活性を示すのに比較して、固形癌細胞には全く効果がみられない等の欠点を有している。これらの欠点を改善する目的で、多数の試みがなされてきた。しかし未だ満足いく化合物は得られていない。著者は、このAra-Cをリード化合物としてCytidine deaminaseの基質とならず、固形癌に対しても効果を示す化合物を開発することを目的として本研究に着手した。そのなかで*in vitro*ではAraCに匹敵する白血病細胞増殖抑制活性を示す

(2'S)-1-(2-deoxy-2-C-methyl- β -D-arabinofuranosyl)cytosine(SMDC)更に*in vivo*でも血液癌のみならず固形癌に対しても、非常に強い活性を示す

2'-deoxy-2'-methylidenecytidine(DMDC)を合成した。この広範な制癌スペクトルを有するDMDCの作用発現機構を解明するため、既知の化合物を含めた各種2'-位置換デオキシシチジン 5'-トリリン酸体を合成し、Calf thymusのDNA polymerase α , β , γ に対する挙動を検討した。他の酵素に対する知見、アリールアルコール系の作用発現関与の可能性を含めDMDCの作用発現機構について報告する。

2'-位分枝糖ピリミジンヌクレオシドの合成

安価に得られる天然のヌクレオシドを出発原料とし、収率良く誘導される2'-ケト体を鍵中間体として2'-位置換基の導入を行なった。アルキル基の導入は、2'-ケト体に対する有機金属試薬の付加反応、続くラジカル還元により行ない、アルキリデン基の導入はWittig反応により行なった。同様の方法により5-位置換体も各種合成した。

2'-位分枝糖ピリミジンヌクレオシド類の制癌活性

得られた各2'-位分枝糖ピリミジンヌクレオシドの白血病細胞増殖抑制活性を検討した。

2'-位アルキル置換体類の中ではSMDCが最も強い活性を示しAraCと同等であった。より嵩高いEt基を置換したSEDCや、2'-位の立体配置を反転したRMDCでは著しく活性が低下した。2'-位メチリデン置換体であるDMDCはSMDCよりも更に強い活性を示した。DMDC,SMDCの種々の培養細胞に対する増殖抑制スペクトルをAraC,5-FUと比較して検討したところ、DMDCは血液癌のみならず固形癌に対しても強い活性を示すことが明かとなった。次に各種マウス癌及びヒト癌を移植したマウスに対しDMDCをi.p.投与した。DMDCは血液癌に対してのみならず、固形癌に対しても高い制癌効果を示した。以上の様にDMDCは*in vivo*においても優れた制癌性を示した。

DNA polymerase α, β, γ に対する阻害様式の検討

リード化合物であるAraCは、生体内で5'-トリリン酸体に変換された後、主にDNA polymerase (Pol) α を阻害し制癌作用を発現すると考えられている。そこで新規アナログについてもCalf thymusのDNA polymerasesに対する挙動を検討した。最初に各種2'-位置換デオキシシチジン 5'-トリリン酸体を合成し、活性化DNAをTemplate-primerとして阻害曲線を求めた。AraCTPは、Pol α の強い阻害物であるがPol β 及び γ はあまり阻害しないことが知られている。ところが今回検討した中で、SMDCTP,DMDCTPはPol α, β, γ すべてを強く阻害した。特にSMDCTPはどの酵素に対しても非常に強く阻害した。阻害様式はどの化合物もdCTPに対する競合阻害であった。

合成オリゴマーをTemplate-primerとするDNA鎖伸長反応における各アナログの挙動

Pol α によるDNA鎖伸長反応で各アナログの挙動を検討したところ各XTP (X=AraC, N₃C, SMDC, DMDC)はTemplate-primer上、Gの位置でdCTPのかわりに取り込まれるが、Xが取り込まれた後の鎖伸長は遅く、ほぼ完全に停止した。すなわちこれらのXTPはchain terminatorとして挙動した。

次にdCTPに対する相対取り込み速度を測定したところ、活性化DNAをTemplate-primerとして求めた酵素との親和性と良く一致する結果を得た。これは酵素と各アナログの複合体から伸長反応が進み、各アナログがDNA鎖に取り込まれるまでの速度がdCTPと同様に速やかであることを示している。従ってDMDCTPはdCTPの約3倍の親和性でPol α と結合し、速やかにDNA鎖に取り込まれる。しかしその先の鎖伸長は非常に遅く、chain terminatorとして挙動する。ということが明らかになった。

DMDCの作用機序

Stubbeらにより、DMDCジリン酸体は大腸菌のRibonucleotide reductaseを阻害する事が示された。その作用機序は予想されたように3'-位のアリルラジカルを経由するものと考えられた。これらのことからDMDCは生体内で代謝を受けジリン酸体はRibonucleotide reductaseを阻害し、トリリン酸体はPol α, β, γ すべてを強く阻害するという新しい作用機序を有する制癌性ヌクレオシドである事が明かとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松田	彰
副査	教授	大塚	栄子
副査	教授	有賀	寛芳
副査	助教授	井上	英夫

現在の癌治療において化学療法は重要な位置を占めている。その中で核酸関連代謝拮抗剤は、発癌性が少なく、代謝活性化を経て間接的に効果を示すため選択毒性が期待できるなどの長所を有し、薬剤選択の際に優先度が高い。しかし固形腫瘍に効果を示すのは、5-fluorouracil (5-FU) 誘導体が大部分であり適用範囲が限られている。現在では各種制癌剤の併用療法が主流であるが、5-FUとは異なった制癌スペクトルを有する新しい核酸関連代謝拮抗物質の開発が強く望まれている。

1) 2'-位分枝糖ピリミジンヌクレオシドの合成と白血病細胞増殖抑制活性

安価に得られる天然のウリジンを出発原料とし、収率良く誘導される2'-ケト体を鍵中間体として用いた。これに対する種々の有機金属試薬を付加させ、生成した三級アルコールのラジカル的還元により目的とする2'-アルキル-2'-デオキシ- β -D-アラビノフラノシルピリミジンヌクレオシドを種々合成した。このラジカル的な三級アルコールのデオキシ化反応はメチルオキサリルエステル体を経由して行なうことにより極めて円滑にしかも立体選択的に進行するが明かになった。

以上のようにして合成した2'-デオキシ-2'-C-メチル- β -D-アラビノフラノシルシトシン(SMDC)はin vitroで現在白血病の治療薬として臨床使用されているara-Cとほぼ同等の増殖阻害活性をマウス白血病細胞L1210で示した。一方、2'-エチル体(SEDCTP)はほとんど活性を示さないことから、2'-位置換基の立体的嵩だかさが活性発現に重要であることが明かになった。しかしながらSMDCはヒト固形癌由来の細胞に対してはほとんど増殖阻害活性を示さず、その制癌スペクトルはara-Cのそれと類似していることが明かになった。

2) 2'-デオキシ-2'-メチリデンシチジンの合成と制癌活性

一方、上述した化合物とは異なりヌクレオシドそれ自体は化学的に安定であるが代謝活性化された後にDNA分子に取り込まれDNA鎖を切断するような化合物をデザインする中から生まれたのが2'-デオキシ-2'-メチリデンシチジン(DMDC)である。DMDCは先の2'-ケト体にWittig反応を行ない合成出来た。

DMDCはL1210細胞に対してara-CやSMDCとほぼ同等の増殖阻害活性を示し、更にヒト固形癌由来の細胞に対してもin vitroで強い増殖阻害活性を示した。DMDCはL1210, P388等のマウスの癌にのみならずara-Cや5-FUが効果を示さないLX-1, SK-Mel-28等のヒト由来の癌細胞を移植したヌードマウスに対してもin vivoで強力な制癌効果を示した。

3) 種々の2'-位置換シチジン類 5'-トリリン酸体のDNAポリメラーゼ α, β, γ に対する阻害様式の検討

先に述べたSMDCやDMDCは強力な細胞増殖抑制活性を示したのでそれらの作用機序を調べる一環としてこれらの5'-トリリン酸体を合成し牛胸腺由来のDNAポリメラーゼ α, β, γ について阻害様式を検討した。DMDCの5'-トリリン酸体(DMDCPTP)はpol α, β, γ をそれぞれ $K_i = 0.42, 2.52, 1.0 \mu\text{M}$ で阻害し、その様式は基質であるdCTPに対する競争阻害であることがLineweaver-Burk plotから明かになった。それに対してSMDCTP(SMDC 5'-トリリン酸)はpol α, β, γ を $K_i = 0.05, 0.10, 0.07 \mu\text{M}$ で阻害しDMDCやara-C($K_i = 1.10 \mu\text{M}$)よりも強力な競争阻害剤であることが明かになった。一方、2'-エチル体(SEDCTP)はいずれのポリメラーゼに対しても弱い阻害しか示

さなかった。以上のことからDNAポリメラーゼに対する阻害にはメチル基のような脂溶性の高い基が、更に立体的に嵩だかくない基の存在が重要であることが明かになった。

次に、これらの阻害剤の阻害様式を更に詳しく調べるために合成テンプレートプライマー上での鎖伸張反応をゲル電気泳動法を用いて検討した。その結果、これらの阻害剤はいずれもチェーンターミネーターとして作用していることが明かとなった。

以上のように本研究は新規制癌性ヌクレオシドSMDC, DMDCをデザインし合成したこと更にその作用機序の一つであるDNAポリメラーゼに対する阻害様式を明かにしたもので博士(薬学)の学位を授与するに足る内容を持つものと認定した。