

学位論文題名

抗腫瘍活性を持つ新規ヌクレオシド,
2'-C-cyano-2'-deoxy-1- β -D-
arabinofuranosylcytosine(CNDAC)の作用機序

学位論文内容の要旨

現在急性白血病薬として臨床的に応用されているAra-Cを母化合物に、ヌクレオシド自体は化学的に安定であるが、生体内で代謝されDNAやRNAに取り込まれた時に反応性を発揮する化合物の分子設計を目指した。

1. CNDACの分子設計と合成

2'-Deoxycytidineの2'- β 位に強い電子吸引基を導入すると2'- α プロトンの酸性度が増すことが予想される。この誘導体がAra-Cと同様の経路でDNAに取り込まれた時、隣接するリン酸基の酸素原子や他の求核分子の攻撃による2'- α プロトンの引き抜き、続いて β 脱離によりDNA鎖切断が起こるのではないかと考えた。そこでこのDNA鎖切断仮説を実現する化合物として、筆者は電子吸引基としてシアノ基を導入した2'-C-cyano-2'-deoxy-1- β -D-arabinofuranosylcytosine(CNDAC)をデザインした。その合成はシチジンから容易に得られるN⁴-アセチルシチジンの2'-ケト体を出発原料とし、シアノヒドリン体に変換した後、3級水酸基をフェノキシチオカルボニル化し、次いでラジカル還元を行い更に脱保護してCNDACを塩酸塩として高収率で得た。

2. CNDACの化学的安定性

CNDACを塩基性条件下で37℃に加温してその安定性を検討したところ、2'- β シアノ基が反転した2'-C-cyano-2'-deoxycytidine(CNDC)と、グリコシル結合が開裂した時の産物であるシトシンとグリカル体の3種の化合物の生成が見られた。これらの化合物は、CNDACの酸性度が高まっている2'- α プロトンが塩基により引き抜かれることで生成したと考えられた。またこの時CNDACとCNDCの間には平衡が成立し、グリコシル結合の開裂は両化合物において一定速度でゆっくりと起こることをシュミレーションにより証明した。

3. CNDACの抗腫瘍活性

CNDACはin vitroにおいて強い細胞増殖抑制活性を示し、その抗癌スペクトルはAra-Cとは異なることが明かとなった。またin vivoにおいても、マウス白血病細胞P388に対してCNDACを20mg/kg、1日1回10日間連続ip投与したところ、延命率(T/C値)が600%以上という値を示した(Ara-CのT/C値は225%)。またヌードマウスに移植したヒト胃癌St-4細胞に対しても、CNDACを67.5mg/kg、5日間連続投与、2日間連休のスケジュールで繰り返す

返し経口投与したところ、担癌ヌードマウス5匹中5匹に癌細胞が観察されなくなった。またCNDACの培地中で殆どシアノ基が反転しない短時間接触(20分)でその細胞増殖抑制活性はCNDACの約1/20であり、またin vivoでも殆ど抗腫瘍活性を示さないため、CNDAC自体には殆ど抗腫瘍活性はないことが示唆された。

4. CNDACの作用機序

CNDACのDNA、RNA、蛋白質の高分子合成に与える影響を癌細胞(colo 320DM)を用いて検討したところ、Ara-Cと同様にCNDACはDNA合成を阻害するだけでなく、同時にRNA合成も阻害するという特異的な挙動を示した。またCNDACはG2/M期で細胞周期を停止させるという核酸系代謝拮抗剤としては特異的な挙動を示した。次にCNDACの細胞内代謝を検討するため $[^{14}\text{C}]$ -CNDACをKB細胞に添加して代謝物を調べたところ、 ^{14}C で標識されたCNDACの5'-モノ、ジ、トリリン酸体の生成が確認された。更に癌細胞(KB細胞)に対してCNDACと種々の天然型ヌクレオシドを併用して細胞増殖抑制活性を調べたところ、2'-deoxycytidineと併用した時に最も増殖抑制活性が減弱したことから、CNDACはAra-Cと同様にdeoxycytidine kinaseによりリン酸化を受けることが明かとなった。 $[^{14}\text{C}]$ -CNDACを癌細胞(colo 320DM)に添加した後、細胞からDNA、RNA画分を抽出したところ、 $[^{14}\text{C}]$ -CNDACはDNA画分から検出され、CNDAC自体はDNA分子中に取り込まれたことが明かになった。これらの結果より、CNDACはAra-Cと同じ代謝経路で、5'トリリン酸体に代謝され、さらにDNA分子中に取り込まれることが示唆された。一方、Ara-Cの分解酵素であるcytidine deaminaseによる脱アミノ化の受けやすさについて調べたところ、シチジン($K_m=0.22\text{mM}$)が脱アミノ化を受ける速度を1とすると、Ara-C($K_m=0.35\text{mM}$)は0.4であるのに対し、CNDAC($K_m=1.0\text{mM}$)は0.05となり、CNDACが脱アミノ化を受ける速度はAra-Cの1/8であることが明かになった。

5. CNDACTPのDNA polymerase、RNA polymeraseに対する挙動

まずCNDACのRNA合成阻害の機構を検討する目的でCNDACのRNA polymeraseに対する挙動を検討した。CNDACの5'トリリン酸体(CNDACTP)を合成し、モデル実験としてT7プロモーターを持つプラスミドをテンプレートとしてT7 RNA polymeraseのCTPの取り込みの阻害を調べたところ、CNDACTPはT7 RNA polymeraseに対して阻害活性を示し、その阻害様式はCTPに対する競合阻害であった($K_i=250\text{ }\mu\text{M}$)。CNDACのDNA合成阻害の機構を検討する目的でのDNA polymerase α ($\text{pol } \alpha$)に対する挙動を検討した。活性化DNAをテンプレート・プライマーとして $\text{pol } \alpha$ のdNTPの取り込み阻害を調べたところ、CNDACTPはAraCTPより強い $\text{pol } \alpha$ に対する阻害剤であり、その阻害様式はdCTPに対する競合阻害であった($K_i=0.16\text{ }\mu\text{M}$)。更に短鎖DNA(10mer)をプライマーとして $\text{pol } \alpha$ によりDNA鎖伸長反応を行い、変性ゲル電気泳動により鎖伸長を観察した。CNDACTPはAraCTPと同様、dCTPのかわりにテンプレート上のGの相補的な位置に取り込まれ、chain-terminatorとして挙動することが明かになった。このときCNDACが3'-末端に取り込まれたDNA鎖を精製して3'-末端の構造決定を行ったところ、CNDACは一部CNDACに変換されていたが、一旦CNDACの3'-側に鎖伸長が起こった後にDNA鎖切断が起こった際にのみ生成する2',3'-ジデオキシ-2',3'-ジデオキシ体(ddCNC)が観察された。Vent(exo-) polymeraseを用いた場合もddCNCの生成が見られたため、CNDACTPはchain-terminatorとして作用しているだけでなくDNA鎖切断を引き起こしていると考えられた。

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	助教授	周東	智
副査	助教授	井上	英夫

学位論文題名

抗腫瘍活性を持つ新規ヌクレオシド, 2'-C-cyano-2'-deoxy-1- β -D- arabinofuranosylcytosine(CNDAC)の作用機序

難治性がんに対する治療薬の開発は極めて重要な課題である。申請者は、現在急性白血病薬として臨床的に応用されているAra-Cを母化合物に、ヌクレオシド自体は化学的に安定であるが、細胞内で代謝されDNAに取り込まれた時に反応性を発揮する新規制がん剤2'-C-cyano-2'-deoxy-1- β -D-arabinofuranosylcytosine(CNDAC)分子設計を行い、その作用機序についての研究を行った。

1. CNDACの分子設計と合成

2'-Deoxycytidineの2'- β 位に電子吸引基を導入すると2'- α プロトンの酸性度が増す。この誘導体がDNAに取り込まれた時、隣接するリン酸基の酸素原子による2'- α プロトンの引き抜き、続いて β 脱離によりDNA鎖切断が起こると仮定した。このDNA鎖切断仮説を実現する化合物として、シアノ基を導入したCNDACを分子設計し、シチジンから2'-シアノヒドリン体を経由し、ラジカル的脱酸素化反応を行い高収率で合成した。

2. CNDACの化学的安定性

CNDACをアルカリ性条件下で37℃に加温して安定性を検討したところ、2'- β シアノ基が反転した2'-C-cyano-2'-deoxycytidine(CNDC)と、グリコシル結合が開裂した産物であるシトシンとグリカル体の3種の化合物が生成した。これらの化合物は、この時CNDACとCNDCの間には平衡が成立し、グリコシル結合の開裂は両化合物において一定速度でゆっくりと起こることをシュミレーションにより証明した。

3. CNDACの抗腫瘍活性

CNDACはin vitroで各種ヒト固形がん由来細胞に対して強い増殖抑制活性を示し、その制がんスペクトルはAra-Cとは異なることを明かにした。in vivoでも、マウス白血病細胞P388に対して延命率(T/C値)が600%以上という値を示した(Ara-CのT/C値は225%)。ヌードマウスに移植したヒト胃癌St-4細胞に対しても、CNDAC投与で5匹中5匹に長期生存が確認され癌細胞の消失を確認した。

4. CNDACの作用機序

CNDACのDNA、RNA、蛋白質合成に与える影響を大腸癌細胞を用いて検討した。CNDACはDNA合成を阻害するだけでなく、RNA合成も阻害した。さらに、CNDACはG2/M期で細胞周期を停止させ核酸系代謝拮抗剤としては特異的な挙動を示した。一方、CNDACは細胞内で5'-モノ、ジ、トリリン酸体に代謝されることを確認した。更に、CNDACと2'- deoxycytidineと併用した時に最も増殖抑制活性が減弱したことから、CNDACはdeoxycytidine kinaseによりリン酸化を受けることが明らかになった。

5. CNDACTPのDNA polymerase、RNA polymeraseに対する挙動

CNDACの5'トリリン酸体(CNDACTP)を用いてT7 RNA polymeraseのCTPの取り込みの阻害を調べた。CNDACTPはRNA polymeraseを阻害し、その様式はCTPに対する競合阻害であった($K_i=250 \mu M$)。一方、DNA合成阻害様式はDNA polymerase α に対し dCTPに対する競合阻害であった($K_i=0.16 \mu M$)。更に短鎖DNAをプライマーとしてpol α によりDNA鎖伸長反応を行ったところ、CNDACTPはdCTPのかわりにテンプレート上のGの相補的な位置に取り込まれ、chain-terminatorとして挙動した。このときCNDACが3'-末端に取り込まれたDNA鎖を精製して3'-末端の構造決定を行ったところ、一旦CNDACの3'-側に鎖伸長が起こった後にDNA鎖切断が起こった際にのみ生成する2',3'-ジデオキシ-2',3'-ジデヒドロ体が観察され、CNDACTPはchain-terminatorとして作用しているだけでなくDNA鎖切断を引き起こしていることを明らかにした。

以上のように本研究は、新しい制がん性ヌクレオシドCNDACを鎖切断仮説により分子設計し、これが強力な制がん活性を示すこと、および作用機序として仮説どおりDNAに取り込まれた後にchain- terminationと鎖切断を引き起こし制がん活性を発現することを証明したので博士(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。