

学位論文題名

デオキシウリジントリホスファターゼ阻害に基づく
制がん薬の創製研究

学位論文内容の要旨

5-FU 系代謝拮抗薬は他の抗悪性腫瘍薬との併用療法が試みられ、消化器癌を中心に幅広い癌種に対し、有効性が示されている。しかしながら、5-FU 系代謝拮抗薬が無効あるいは不十分な症例もあり、更なる有効性が期待できる新薬の開発が急務となっている。5-FU 系代謝拮抗薬は、5-FU の活性本体である 5-フルオロデオキシウリジン 5'-モノリン酸 (FdUMP) が、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸及びチミジル酸合成酵素 (TS) と強固な三者共有結合体を形成して、不可逆的に TS を阻害することで抗腫瘍効果を発揮することが知られている。一方、5-FU 系代謝拮抗薬の殺細胞作用には TS 阻害のみではなく、DNA へのウラシルや 5-FU の誤取り込みも寄与していると考えられている。その作用メカニズムは、TS 阻害の結果、細胞内に多量に蓄積したデオキシウリジン 5'-モノリン酸 (dUMP) 及び 5-FU から代謝されて生じる FdUMP が、デオキシウリジン 5'-トリリン酸 (dUTP)、5-フルオロデオキシウリジン 5'-トリリン酸 (FdUTP) へと代謝された後、DNA ポリメラーゼに誤認識され、DNA に取り込まれるというものである。従って、TS のみならず、TS の下流に関わる因子、例えばウラシルや 5-FU の DNA への取り込みを制御する因子も 5-FU 系代謝拮抗薬に対する抵抗性に関与する要因になると考えられる。

DNA 中へのウラシルや 5-FU の取り込みを制御する因子として、デオキシウリジントリホスファターゼ (dUTPase) が挙げられる。dUTPase は、天然型核酸トリリン酸体の中で dUTP を特異的に認識し、dUMP とピロリン酸に分解するピロホスファターゼであり、ウラシルの DNA への取り込みを未然に防ぎ、かつ TS の基質である dUMP を供給するという二つの役割を担っている。dUTPase の欠如はウラシルの DNA への継続的な誤取り込みを導く。ウラシルで置換された DNA は、塩基除去によって修復されるが、dUTP/TTP 比が高い状態では、最終的に DNA 二本鎖切断を伴う細胞死に至る。dUTPase は、dUTP に加え FdUTP を基質とし、それぞれ dUMP 及び FdUMP へと変換するため、発現の大小は 5-FU 系代謝拮抗薬の効果に影響を与えると考えられる。実際、dUTPase を過剰発現させた細胞では、5-FU 系代謝拮抗薬に対する感受性が低下し¹、siRNA を用いて dUTPase 発現量及び活性を低下させると、5-FU 系代謝拮抗薬の細胞増殖抑制効果が増強することが報告されている²。臨床においても、dUTPase の発現量と癌の悪性度の相関が複数報告されている³。

以上のような背景から、dUTPase 阻害剤の創製研究がいくつかなされているが、現在までの所、ヒト dUTPase に対して十分な阻害活性を持ち、かつ drug-like な化合物は存在していない。従って、筆者は 5-FU 系代謝拮抗薬に対する効果増強のための新たな創薬標的として、新規ヒト dUTPase 阻害剤創製研究に着手した。阻害剤は患者への負担が少なく、外来治療も可能な経口投与型の医薬品を目標とした。

本酵素はウラシル環を厳密に認識していることから、市販及び大鵬薬品工業社内ライブラリーのウラシル誘導体から約 300 化合物を選定し、酵素阻害活性を指標としたスクリーニングを行った。その結果、低活性ながらも低分子量・低疎水性で展開性が見込まれるヒット化合物を見出した。ヒット化合物から dUDP と dUTPase の共結晶構造 (PDB ID:1Q5H) を用いて、論理的に化合物展開を行うことで、阻害活性が 25 倍向上したジメチルスルホンアミド誘導体 ($IC_{50} = 3.9 \mu M$) を見出した。この化合物は、HeLa S3 細胞株において 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (FdUrd) ($1 \mu M$) の細胞増殖抑制効果を用量依存的 ($EC_{50} = 5.1 \mu M$) に増強し

た。一方、単剤では 30 μ M で作用しても、細胞増殖抑制効果を全く示さなかった。以上の結果から、dUTPase 阻害剤は期待通り、FdUrd の細胞増殖抑制効果を増強することが明らかとなった。dUTPase 阻害により FdUrd の細胞増殖抑制効果を増強する低分子化合物の報告例はなく、筆者により明らかにされた⁵。さらに強力な阻害剤を創製するために、ジメチルスルホンアミド誘導体と dUTPase との共結晶を取得・解析することに成功した (PDB ID: 3ARN)。本共結晶構造から、既知の共結晶 (PDB ID: 2HQU) 中で観察される隣接サブユニット C 末端 Phe158 のベンゼン環とジメチルスルホンアミド誘導体の末端ベンゼン環がほぼ重なることが明らかとなった。酵素機能の発現には、基質結合後、隣接サブユニット C 末端の Phe158 ベンゼン環がウラシル環とスタッキングして、基質結合部位をキャッピングすることが必須である⁴ ことから、本化合物の阻害様式は化合物自身が自己スタッキングすることで、隣接サブユニット C 末端ループがキャッピングされないことによると考えられる。自己スタッキング効果をうまく利用することで、同酵素阻害剤を創製した例はなく、この結果により明らかにされた⁵。ジメチルスルホンアミド誘導体から種々の誘導体合成を行ったところ、最終的に非常に強い酵素阻害活性 (IC_{50} = 21 nM) と FdUrd の細胞増殖抑制増強作用 (EC_{50} = 75 nM) を示す *p*-フルオロ置換体を見出した。*p*-フルオロ置換体単剤では細胞増殖への影響は全くない (IC_{50} = 28 μ M)。一方、ジメチルスルホンアミド誘導体と dUTPase との共結晶構造から配座制御型 dUTPase 阻害剤の創製を行った⁶。ジメチルスルホンアミド誘導体は、ウラシル環と末端ベンゼン環が自己スタッキングしており、自由度の大きいリンカー部位は歪みの大きい構造をとっている。このリンカー部位の配座を適切に制御することでエントロピーの損失を抑え、阻害活性が向上すると考えた。自由度の大きいリンカー部位を *p*-フェニレン基あるいは *trans*-アルケニレン基に変換した、フェニレン型配座制御アナログ及びアルケニレン型配座制御アナログをそれぞれ設計し、Molecular Operating Environment (MOE) を用いて三次元構造を推定した。その結果、末端ベンゼン環はいずれの化合物もほぼきれいに重なり、狙い通りの標的分子結合配座をとることが示唆された。両配座制御アナログは、いずれも元の化合物より 2–2.5 倍程度強い *in vitro* 活性を示した。次に、この 2 化合物を基に SAR を実施し、最終的に非常に強い酵素阻害活性 (IC_{50} = 39 nM) と FdUrd の細胞増殖抑制増強作用 (EC_{50} = 66 nM) を示すメタ位置換アルケニレン型配座制御アナログを見出した。

マウス皮下にヒト乳癌株 MX-1 を移植したゼノグラフトモデルを用いて、*p*-フルオロ置換体及びメタ位置換アルケニレン型配座制御アナログと 5-FU 併用における抗腫瘍効果を評価した。その結果、5-FU (15 mg/kg/day) 持続注入と *p*-フルオロ置換体あるいはメタ位置換アルケニレン型配座制御アナログ (300 mg/kg/day) 経口投与を併用した群において、腫瘍抑制率 (IR) = 83, 68% という強力な腫瘍増殖の抑制効果が認められた。一方、5-FU 単剤ではわずかな抗腫瘍効果しか認められず、各 dUTPase 阻害剤単剤では、全く抗腫瘍効果を示さなかった。以上の結果から、dUTPase 阻害剤を 5-FU 系代謝拮抗薬と併用することで、5-FU が無効な癌腫において抗腫瘍効果を増強することが *in vivo* でも明らかとなった^{5,6}。

dUTPase 阻害剤がコンセプト通り 5-FU 系代謝拮抗薬の細胞増殖抑制効果を増強すること、及び共結晶構造から酵素阻害機構を初めて明らかにした。また、見出した強力な dUTPase 阻害剤が MX-1 皮下移植マウスに対して、5-FU の抗腫瘍効果を劇的に増強することを明らかにした。本研究結果より、First-In-Class であるヒト dUTPase 阻害剤を創製することにより、5-FU 系代謝拮抗薬の新たな化学療法開発の可能性が示唆された。

参考文献: 1. Canman, C. E. *et. al. Cancer Res.* **1994**, *54*, 2296. 2. Koehler, S. E. *et. al. Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 620. 3. Ladner, R. D. *et. al. Cancer Res.* **2000**, *60*, 3493. 4. Mol, C. D. *et. al. Structure* **1996**, *4*, 1077. 5. Miyahara, S. *et. al. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2970. 6. Miyahara, S. *et. al. J. Med. Chem.*, in press.

学位論文審査の要旨

主査	教授	周東	智
副査	教授	松田	彰
副査	准教授	市川	聡
副査	准教授	有澤	光弘

学位論文題名

デオキシウリジントリホスファターゼ阻害に基づく 制がん薬の創製研究

博士學位論文審査等の結果について（報告）

本論文は、消化器癌を中心に幅広い癌種に対して有効性が示されている 5-FU 系代謝拮抗薬の有効性増強薬の開発に関するものである。

5-FU 系代謝拮抗薬の作用メカニズムは、TS 阻害の結果、細胞内に多量に蓄積したデオキシウリジン 5'-モノリン酸 (dUMP) 及び 5-FU から代謝されて生じる FdUMP が、デオキシウリジン 5'-トリリン酸 (dUTP)、5-フルオロデオキシウリジン 5'-トリリン酸 (FdUTP) へと代謝された後、DNA ポリメラーゼに誤認識され、DNA に取り込まれるというものである。

ウラシルや 5-FU の DNA への取り込みを制御する 5-FU 系代謝拮抗薬に対する抵抗性に関与する代表的な因子として、デオキシウリジントリホスファターゼ (dUTPase) が挙げられる。dUTPase は、ウラシルの DNA への取り込みを未然に防ぎ、かつ TS の基質である dUMP を供給するという二つの役割を担っている。dUTPase の欠如はウラシルの DNA への継続的な誤取り込みを導く。dUTPase は、dUTP に加え FdUTP を基質とし、それぞれ dUMP 及び FdUMP へと変換するため、発現の大小は 5-FU 系代謝拮抗薬の効果に影響を与える。実際、dUTPase を過剰発現させた細胞では、5-FU 系代謝拮抗薬に対する感受性が低下する。臨床においても、特定の癌種において、dUTPase の発現量と癌の悪性度の相関が複数報告されている。即ち、dUTPase 阻害剤を 5-FU 系代謝拮抗薬と併用すると、ウラシルや 5-FU の DNA への取り込み量を劇的に増加させ、これまで十分な有効性が得られなかった腫瘍に対して効果を発揮する、新たな治療法になることが期待される。

以上のような背景から、著者は新規ヒト dUTPase 阻害剤創製研究に着手した。

1. ヒット化合物探索

本酵素はウラシル環を厳密に認識していることから、阻害剤にはウラシル環が必須と考え、ウラシル誘導体約 300 化合物を選定し、酵素阻害活性を指標としたスクリーニングを行った。その結果、低活性ながらもヒット化合物 1 を見出した。

2. Hit to Lead

化合物 1 から dUDP と dUTPase の共結晶構造 (PDB ID:1Q5H) を用いて、論理的に化合物展開を行うことで、阻害活性が 25 倍向上した化合物 2 ($IC_{50} = 3.9 \mu M$) を見出した。化合物 2 は、HeLa S3 細胞株において FdUrd ($1 \mu M$) の細胞増殖抑制効果を用量依存的 ($EC_{50} = 5.1 \mu M$) に増強した。一方、単剤では $30 \mu M$ で作用しても、増殖抑制効果を示さなかった。以上の結果から、dUTPase 阻害剤は期待通り、FdUrd の細胞増殖抑制効果を細胞レベルで増強することが明らかとなった。

3. 結合様式及び作用機序解析

化合物 2 と dUTPase との共結晶 を取得し、 1.8 \AA の高解像度で解析することに成功した。本共結晶構造から、本化合物の阻害様式は化合物自身が自己スタッキングすることで、隣接サブユニット C 末端のキャッピングを阻害することが明らかとなった。

4. 化合物 2 からの展開

化合物 2 から種々の誘導体合成を行ったところ、最終的に非常に強い酵素阻害活性 ($IC_{50} = 21 \text{ nM}$) と FdUrd の細胞増殖抑制増強作用 ($EC_{50} = 75 \text{ nM}$) を示す化合物 3 を見出した (図 3)。3 単剤では細胞増殖への影響は全くない ($IC_{50} = 28 \mu M$)。

5. 化合物 3 の in vivo 薬効評価

マウス皮下にヒト乳癌株 MX-1 を移植したゼノグラフトモデルを用いて、化合物 3 と 5-FU 併用における抗腫瘍効果を評価した。その結果、5-FU (15 mg/kg/day) 持続注入と 3 (300 mg/kg/day) 経口投与を併用した群において、腫瘍抑制率 (IR) = 83, % という強力な腫瘍増殖の抑制効果が認められた。以上の結果から、dUTPase 阻害剤を 5-FU 系代謝拮抗薬と併用することで、5-FU が無効な癌腫において抗腫瘍効果を増強することが in vivo でも明らかとなった¹。

以上のように、dUTPase 阻害剤が作業仮説通り 5-FU 系代謝拮抗薬の細胞増殖抑制効果を増強すること、及び共結晶構造から阻害剤の結合様式ならびに酵素阻害機構を初めて明らかにした。また見出した強力な dUTPase 阻害剤 3 が MX-1 皮下移植マウスに対して、5-FU の抗腫瘍効果を劇的に増強することを明らかにした。本研究結果は、5-FU 系代謝拮抗薬の新たな化学療法開発の可能性が示すものである。よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格があるものと認める。