

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005 年度 ～ 2009 年度
 課題番号：17016001
 研究課題名（和文）抗がん性核酸誘導体の設計

研究課題名（英文）Design of Nucleosides Antitumor Agents

研究代表者 松田 彰 (MATSUDA AKIRA)
 北海道大学大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：90157313

研究成果の概要（和文）：現在臨床試験中のヌクレオシド系代謝拮抗剤 CNDAC は鎖切断という障害を DNA に付与し，RNA 合成阻害剤である ECyd は，チェックポイント機構で重要な抗アポトーシスタンパク質の発現抑制を行うことを明らかにした。そこで，新規 Chk1 阻害剤の構造を基にする分子設計を行い、UCN-01 よりも強力な PGED (IC50 = 2.8 nM)を見出した。また，Chk1 をクライアントの一つとする分子シャペロン Hsp90 を標的とする多角的な阻害剤開発を行った。

研究成果の概要（英文）：We have been developing nucleoside antimetabolites CNDAC and ECyd as new types of antitumor agents. After incorporation of CNDAC in DNA-strands, strand-breaks were induced. In order to repair the breaks, G2-check point was activated. Therefore, it is important to develop its abrogators for combination therapy. We designed a new Chk1 inhibitor, PGED (IC50 = 2.8 nM), which has combination effects with SN-38. ECyd is a potent inhibitor of RNA polymerase after its conversion to the corresponding 5'-triphosphate. In combination treatment with X-ray irradiation and ECyd, antitumor effects towards colon 26 tumors in vivo were effectively enhanced, due to inhibition of expression of antiapoptotic protein such as survivin. We also found that by increasing the length of the bridging linker, the PU3 (an Hsp90 inhibitor) dimmers became more cytotoxic against human breast cancer cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	9,000,000	0	9,000,000
2006 年度	9,000,000	0	9,000,000
2007 年度	9,000,000	0	9,000,000
2008 年度	9,000,000	0	9,000,000
2009 年度	9,000,000	0	9,000,000
総計	45,000,000	0	45,000,000

研究分野：がん特定領域研究

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：(1)代謝拮抗剤 (2)ECyd (3)RNA ポリメラーゼ (4) CNDAC (5) DNA ポリメラーゼ (6) DNA 鎖切断 (7) G2 アレスト (8) アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年のライフサイエンスの目覚ましい進歩によってがん化や浸潤・転移のメカニズム

が分子レベルで明らかにされてきた。このような基礎研究の成果によりこれまで有効な治療法の乏しかった難治性がんに対しても

新たな治療法が確立されつつある。しかし、難治性がんや進行性がんには未だに有効な治療法のないものが多く、その開発は急務である。

2. 研究の目的

[1] CNDAC や ECyd の抗がん性発現機序をさらに明らかにし、有効な併用剤開発に繋げる。

[2] Chk1 阻害剤の構造を基にする開発。

[3] Hsp90 阻害剤の構造を基にする開発。

3. 研究の方法

[1] CNDAC による鎖切断の修復機序の解析、および、ECyd による RNA 合成阻害の影響の解析

[2] 既知の Chk1 阻害剤である UCN-01 は高度な血中蛋白結合のために臨床試験が中断されている。そこで、すでに公表されている Chk1 の構造を基にして新規阻害剤を設計する。ドッキングソフト Glide を使用する in silico デザインと化学合成の組み合わせで合理的な阻害剤設計・合成を行う。

[3] Hsp90 は細胞内で二量体として存在している。そこで既知の Hsp90 阻害剤を二量化し、Hsp90 の ATP 結合部位間を繋ぐ阻害剤を設計する。

4. 研究成果

[1] CNDAC による DNA 鎖切断が起きると、一本鎖結合蛋白 (RPA) が結合し、ATRIP をリクルートする。その後、Chk1 のリン酸化を促進する。活性化された Chk1 は Cdc25C (ホスファターゼ) を阻害し、G2 アレストに関与している。従って、Chk1 阻害剤である UCN-01 との併用で G2 アレストが abrogate されアポトーシスが增強される。一方、代謝活性化された ECyd は RNA polymerase を阻害 ($K_i = 20 \text{ nM}$) し、新規な RNA 合成が阻害される。一般に細胞周期に関与する蛋白は誘導型で短寿命であり、ECyd による RNA 合成阻害で大きく影響を受ける。X線照射と ECyd の併用で、in vitro のみならず in vivo でも併用効果が観察された。この時、がん細胞の CDK1, cyclin B1 や Wee1 などとともに、抗アポトーシス蛋白である survivin や多くの固形がんで過剰発現している HIF-1 α の発現抑制が観察された。

[2] Glide による in silico デザインと化学合成の組み合わせで UCN-01 ($IC_{50} = 5.6 \text{ nM}$) より強力な PGED ($IC_{50} = 2.8 \text{ nM}$) を見出した。PGED は、カンプトテシンの活性本体である SN-38 に対して 4 倍の活性化が観察された。

[3] 既知の Hsp90 の弱い阻害剤である PU3 の結合に関与しない部分をアルキルリンカーで結合し二量体を合成した。Hsp90 二量体の

ATP 結合部位間の距離と考えられる炭素鎖 20 で二量化した化合物は、ヒト乳がん細胞に対する細胞増殖抑制活性が最大に達し、PU3 の 20-30 倍活性が增強した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1) T.Naito, T.Yokogawa, S.Takatori, K.Goda, A.Hiranoto, A.Sato, Y.Kitade, T.Sasaki, A.Matsuda, M.Fukushima, Y.Wataya, H-S.Kim. Role of RNase L in apoptosis induced by ECyd. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 837-50 (2009). 査読有

2) H.Kazuno, A.Fujioka, M.Fukushima, Y.Wataya, A.Matsuda, T.Sasaki. ECyd (TAS-106), a novel potent inhibitor of RNA polymerase, potentiates the cytotoxicity of CDDP in human cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Oncol.* 34, 1373-80 (2009). 査読有

3) K.Yoshida, K.Yamaguchi, A.Mizuno, Y.Uno, A.Asai, T.Sone, H.Yokosawa, A.Matsuda, M.Arisawa, S.Shuto. Three-dimensional structure-activity relationship study of belactosin A and its stereo- and regioisomers: development of potent proteasome inhibitors by a stereochemical diversity-oriented strategy. *Org. Bio. Chem.* 7, 1868-77 (2009). 査読有

4) A.Takada, H.Kamiya, S.Shuto, A.Matsuda, H.Harashima. PK-PD modeling of 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine and the enhanced antitumor effect of its phospholipid derivatives in long-circulating liposomes. *Int. J. Pharm.* 377, 52-59 (2009). 査読有

5) X.Liu, A.Matsuda, W.Plunkett. ATR and DNA-PK cooperate in G2 checkpoint activation by the DNA strand-breaking nucleoside analogue, CNDAC. *Mol. Cancer Ther.* 7, 133-42 (2008). 査読有

6) Y.Wang, X.Liu, A.Matsuda, W.Plunkett. Repair of CNDAC-induced DNA single-strand breaks by transcription-coupled nucleotide excision repair. *Cancer Res.* 68, 3881-89 (2008). 査読有

7) K.Muranaka, A.Sano, S.Ichikawa, A.Matsuda. Synthesis of Hsp90 inhibitor dimers as potential antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5862-70 (2008). 査読有

8) H.Yasui, A.Ogura, T.Asanuma, A.Matsuda, I.Kashiwakura, M.Kuwabara, O.Inanami. Inhibition of HIF-1 α by the anticancer drug TAS106 enhances X-ray-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Cancer* 99, 1442-52 (2008). 査読有

9) H.Kazuno, Y.Shimamoto, H.Tsujimoto, M.Fukushima, A.Matsuda, T.Sasaki.

Mechanism of action of a new antitumor ribonucleoside, ECyd (TAS-106), differs from that of 5-fluorouracil. *Oncology Rep.* 17, 1453-60 (2007). 査読有

10) M. Ohtawa, S. Ichikawa, Y. Teishikata, M. Fujimuro, H. Yokosawa, A. Matsuda.

CNDAG, a potent antitumor agent against B-lymphoma infected with Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV). *J. Med. Chem.* 50, 2007-10 (2007). 査読有
11) H. Yasui, O. Inanami, T. Asanuma, D. Iizuka, T. Nakajima, Y. Kon, A. Matsuda, M. Kuwabara. Treatment combining X irradiation and a ribonucleoside anticancer drug, ECyd, synergistically suppresses the growth of tumor cells transplanted in mice. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 68, 218-28 (2007). 査読有

12) E. Takahashi, O. Inanami, T. Ohta, A. Matsuda, M. Kuwabara. Lipid raft disruption prevents apoptosis induced by 2-chloro-2'-deoxyadenosine in leukemia cell lines. *Leuk. Res.* 30, 1555-61 (2006). 査読有

[学会発表] (計6件)

1) 館林奈々 et al. 構造に基づいた薬物設計による Chk1 阻害剤の開発研究. 日本薬学会第130年会 (岡山) 2010年3月28日

2) 市川聡 et al. 構造に基づいた薬物設計による新規チェックポイントキナーゼ1阻害剤の開発研究. 第13回がん分子標的治療研究会 (徳島) 2009年6月26日

3) 村中一大 et al. Hsp90-N, C末端結合分子二量体の合成並びに生物活性. 日本薬学会第128年会 (横浜) 2008年3月27日

4) 村中一大 et al. 分子シャペロン Hsp90 を標的とした小分子シクロファン型アデニン誘導体の創製研究. 第12回がん分子標的治療研究会 (東京) 2008年6月26日

5) 佐古友希 et al. Check point kinase 1 (Chk1) の構造に基づく新規阻害剤の開発研究. 第27回メデシナルケミストリーシンポジウム (大阪) 2008年11月26日

6) 村中一大 et al. Structure-Based Drug Design による分子シャペロン Hsp90 阻害剤の創製. 第26回メデシナルケミストリーシンポジウム (相模大野) 2008年11月26日

[図書] (計2件)

1) 南川典昭, 松田 彰. siRNA 分子のデザインとターゲティング: 『がん分子標的治療研究-実践マニュアル』 日本がん分指標的治療学会編集 (曾根三郎、鶴尾隆編集代表)、pp164-170, 金芳堂 (2009年)

2) 南川典昭, 松田 彰. スーパー核酸: 4'-チオ核酸の合成から核酸医薬開発に向けた基礎研究の展開, 化学フロンティア『創薬をめざす有機合成戦略: 進化する医薬品づくり』, 穴戸宏造、新藤 充編, pp157-164, 化学同人 (2007年)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1) 名称: 新規ピロロカルバゾールジオン化合物又はその塩

発明者: 市川 聡、佐古友希、佐野亜希子、松田 彰

権利者: 大鵬薬品工業株式会社、北海道大学
種類: 特許

番号: 特願 2008-276771

出願年月日: 平成 20 年 10 月 28 日

国内外の別: 国内

2) 名称: 新規プリンダイマー化合物またはその塩, およびその用途

発明者: 村中一大, 市川 聡, 松田 彰, 佐野亜希子

権利者: 大鵬薬品工業株式会社、北海道大学
種類: 特許

番号: 特願 2007-279056

出願年月日: 平成 19 年 10 月 26 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 松田 彰 (MATSUDA AKIRA)、北海道大学大学院薬学研究院、教授

研究者番号: 90157313

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし