

令和元年6月3日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15481

研究課題名(和文) がん免疫療法のための創薬化学：環状ジヌクレオチドを基盤としたSTING作動薬創製

研究課題名(英文) Medicinal chemistry on cyclic dinucleotides as immunotherapeutic agents.

研究代表者

田良島 典子 (TARASHIMA, Noriko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・助教

研究者番号：90755183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低(中)分子化合物のよるがん免疫療法薬の創出へ向けて、環状ジヌクレオチド類(CDNs)をシードとした創薬化学研究を実施した。CDNsの医薬応用へ向けては、分子内に存在する2つのリン酸ジエステル部に由来する負電荷の解消が有効である。そこで本研究では、リン酸時エステル部のプロドラッグ化ならびに、環状ジペプチドを基本骨格とする非リン酸ジエステル部含有アナログの創製という2つの戦略から等価体アナログの獲得に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、がん免疫療法薬の中心は、PD-1などのT細胞免疫チェックポイント分子に対するモノクローナル抗体(免疫チェックポイント阻害薬/2018年ノーベル医学生理学賞)であるが、高い治療効果を発揮する反面、その高額な薬剤費ゆえに、医療費破綻の懸念が大きな社会問題となっている。この現状を打破するため、本研究では、がん免疫賦活作用を有することが知られている環状ジヌクレオチド類をシードとした創薬化学研究を実施し、いくつかの有用なアナログを獲得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently, cyclic dinucleotides (CDNs) are fascinating molecules in drug discovery, because CDNs were identified as the ligands of stimulator of interferon genes (STING), which mediates innate immune responses. However, there are some issues to be solved for the development of drug candidates based on the CDNs themselves. First, the penetration of cell membrane is hampered by the negatively-charged phosphate groups of CDNs. Second, cytoplasmic phosphodiesterases can easily break the phosphodiester bond of CDNs. Therefore, in this study, we explored explore novel compounds to develop a CDN-based drugs from two strategies: 1) prodrug development, and 2) creation of cyclic dipeptide-type analogs without negatively-charged phosphate groups.

研究分野：核酸創薬化学

キーワード：環状ジヌクレオチド がん免疫療法 化学修飾核酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医学・薬学の発展に伴い、人の平均寿命は年々上昇している。しかしその一方で、がんによる死亡者数は拡大の一途をたどり、我が国でも年間約 37 万人ががんにより亡くなっている (2015 年厚労省統計)。このような現状を打破するため、外科的治療、化学療法、放射線治療に次ぐ第 4 の新規がん治療法として「がん免疫療法」が脚光を浴びている。がん免疫療法では、通常、がん細胞特異的なペプチド等が抗原として用いられ、アジュバント (補助剤) と呼ばれる自然免疫応答を賦活化する分子の助けを借りて抗原特異的な獲得免疫を誘導することで、がん細胞を死滅させる。したがって、抗原の投与量を減少させつつ望みの免疫応答を誘導するためには、アジュバントの適切な選択が鍵を握る。例えば、臨床において高い治療効果を発揮している抗 PD-1 抗体 (オプジーボ®) によるがん免疫療法においても、アジュバントによる効果的な自然免疫応答の賦活化が極めて有効であることが報告されている¹⁾。

2. 研究の目的

このような背景の下、本研究課題では「がん免疫療法」に対する新たなアプローチとして、近年発見された **stimulator of interferon genes (STING)** に対するアゴニストを創製し、これをがん免疫アジュバントとして利用することを提案する。

3. 研究の方法

STING とは小胞体に局在する膜タンパク質であり、主に外来性 DNA 等との結合を介して自然免疫応答を誘導する。しかし、DNA 等のバイオ高分子はアジュバントとしての医薬応用が難しい。一方、ここ 5 年ほどの間に、細菌のセカンドメッセンジャーとして古くから知られるヌクレシドモノリン酸が 2 分子環化縮合した化合物である環状ジヌクレオチド類 (cyclic di nucleotides, CDNs) (図 1) がヒト細胞内において STING の認識を受け、自然免疫応答 (I 型 INF) を強く誘導することが明らかとなってきた (D. Burdette *et al*, *Nature* 2011, 478, 515)²⁾。すなわち、がん免疫アジュバント候補化合物としての CDNs に大きな期待が寄せられている。しかし、CDNs の医薬応用へ向けには、(1) 高い親水性とリン酸部の持つ負電荷による著しい細胞膜透過性の乏しさ、(2) 細胞内のホスホジエステラーゼによる分解といった問題が生じる。そこで本研究課題では、膜透過性ならびに生体内安定性の高い CDNs 等価体アナログを創製し、新規がん免疫アジュバント創製を実現する。

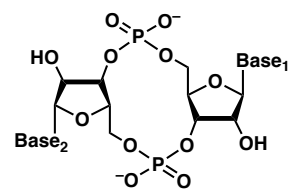


図 1 CDNs の構造

4. 研究成果

(1) 亜リン酸の段階的活性化を駆動力とする CDNs 合成法の開発とアナログ活性評価

亜リン酸の段階的活性化を駆動力とする CDNs の簡便合成法を開発した。簡便合成法の確立は、本研究課題が目指す CDNs の創製化学展開の核を成す。

立案した合成法を図 2 に示した。本合成法は、一般的な RNA 固相合成条件を液相へ適用することでダイマー化合物 **4** を得た後、CDN 合成の鍵となる環化反応 (**5**→**7**) をアミダイトリン原子 (III) の段階的活性化により達成するものである。本合成法では、全ての合成中間体がリン酸部に由来する負電荷を有さないため、従来法の問題点であった単離精製操作が格段に容易となり、各種 CDN アナログを自在に合成可能となった。

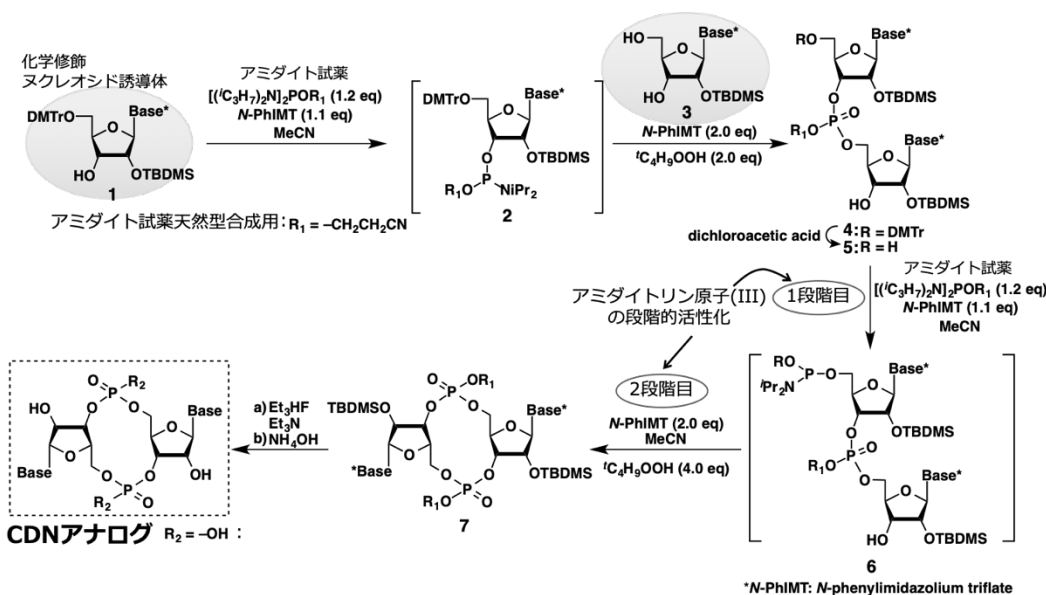


図 2 亜リン酸の段階的活性化を駆動力とする CDN 合成法の概略

確立した簡便合成法を基に、CDNsにおいて水素結合のドナーおよびアクセプターとなるヘテロ原子を欠損・置換したアナログを数種合成した。また、リン酸ジエステル部のプロドラッグ化による中性アナログについても合成を行った。

得られたアナログの STING アゴニスト活性を評価するため、レポーターアッセイ系を確立した。STING (WT) およびその変異株 STING (A230)を 293T-Dual™ Null Cells (Invivogen 社) へそれぞれ遺伝子導入し、恒常発現株を樹立した。これにより、STING 刺激活性に応じた SEAP の発現が観察される。現在、樹立したアッセイ系を用いて、合成した各種アナログのアゴニスト活性を評価しているところである。

(2) 環状ジペプチド型 CDN アナログの開発

プロドラッグ化によるリン酸ジエステル部の保護に加え、リン酸ジエステル部を持たない等価体アナログの開発にも取り組んだ。

Shang らのグループによって報告された c-di-GMP と STING との共結晶構造⁵によると、CDN はダイマーとして存在する 2 つの STING の間に位置し、c-di-GMP の 2 つの核酸塩基部はそれぞれ STING と水素結合を介して強く相互作用しているものの、糖部ならびにリン酸ジエステル部における相互作用はそれほど重要でないこと示唆される。すなわち、適切なリンカーを用いて、2 つの核酸塩基を配置することができれば、より細胞膜透過性ならびに生体内安定性の高い CDN アナログを創製出来ると考えた。

ところで、環状ペプチド構造を持った化合物は、高い細胞膜透過性や消化過程における耐性を持つ傾向があることが知られており、シクロスポリンなど、これまでに有用な薬理活性を有する化合物が見出されている。そこで本研究では、環状ジペプチドをテンプレートとした非リン酸時エステル部含有アナログの探索を行った。

アデニン塩基に対して 2-bromo-1,1-dimethoxyethane を作用させ、ジメチルアセタール体 **8** を得た (図 3)。続いて、塩基部 6 位のアミノ基を Cbz 基で保護し、得られた化合物 **9** を塩酸処理することでアルデヒド体 **10** とアセタール体 **11** を混合物として得た。得られた混合物を、別途合成したペプチドリinker **12** との還元的アミノ化の条件に附すことにより、モノマーユニット **13** を得た。このものを piperidine 処理あるいは TFA 処理することで、N 末端あるいは C 末端無

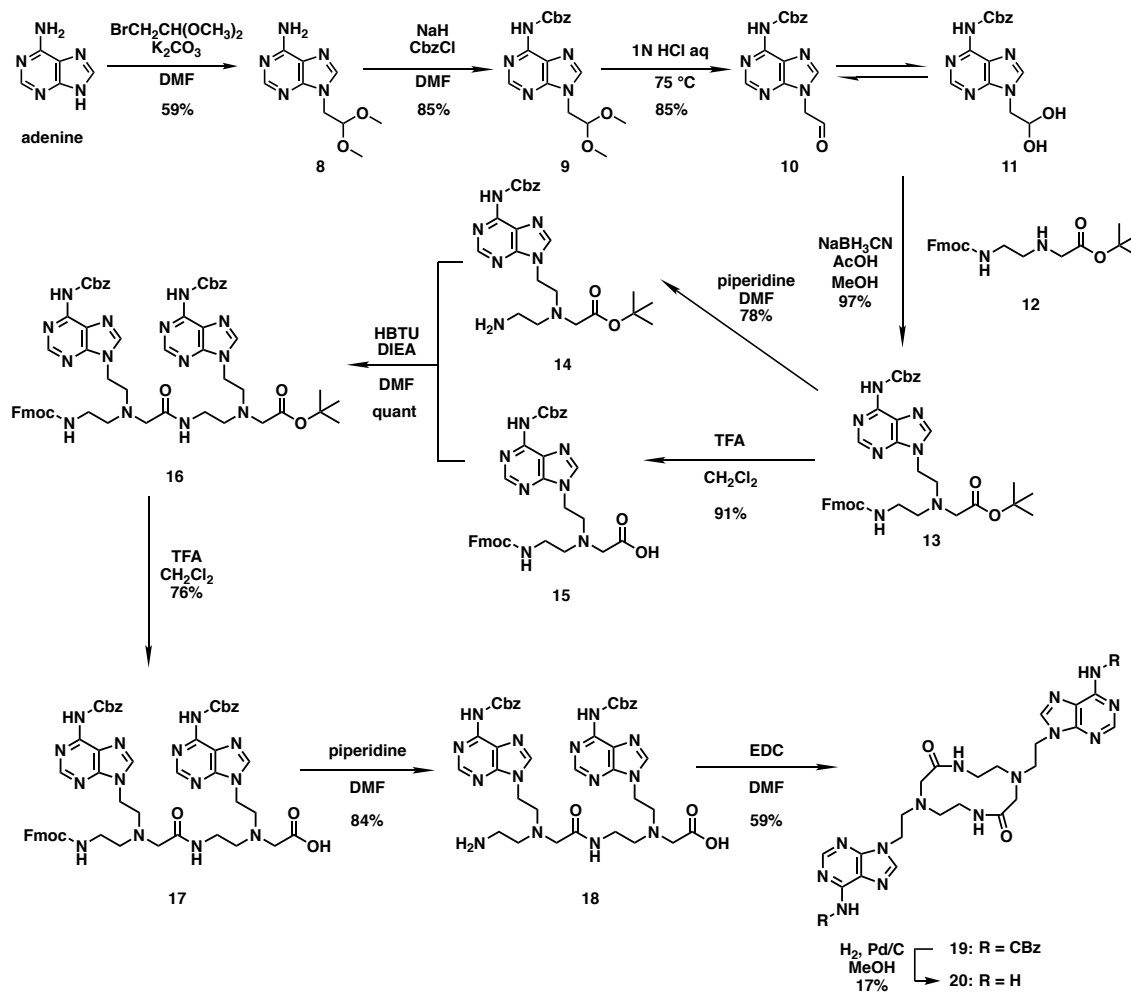


図 3 環状ジペプチドアナログの合成

保護体 **14** および **15** とした後、これらを HBTU および DIEA により縮合することで、ダイマー化合物 **16** を得た。得られたダイマー化合物 **16** の両末端部を、先と同様の手法にて順次脱保護し、化合物 **18** とした後、希薄溶液条件下、HBTU および DIEA を作用させたところ、反応は円滑に進行し、環化保護体 **19** を得た。最後に、接触還元により Cbz 基を除去し、目的化合物 **20** の合成を達成した。本設計では、アミノ酸残基、リンカー鎖長ならびに核酸塩基を種々変更することでライブラリーの構築が可能である。同様の手法にていくつかのアナログの獲得に成功しており、先に樹立したレポーターアッセイ系を用いた構造活性相関解析を実施中である。

<引用文献>

1. S. Spranger, R. Spaapen, Y. Zha, J. Williams, Y. Meng, T. Ha, T. Gajewski, Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells, *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 200ra116.
2. D. Burdette, K. Monroe, K. Sotelo-Troha, J. Iwig, B. Eckert, M. Hyodo, Y. Hayakawa, R. Vance, STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP, *Nature* **2011**, *478*, 515–518.
3. Y. Hayakawa, R. Kawai, A. Hirata, J. Sugimoto, M. Kataoka, A. Sakakura, M. Hirose, R. Noyori, Acid/Azole complexes as highly effective promoters in the synthesis of DNA and RNA oligomers via the phosphoramidite method, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8165–8165.
4. F. Puech, G. Gosselina, I. Lefebvrea, A. Pompon, A. M. Aubertinb, A. Kirnb, J. L. Imbach, Intracellular delivery of nucleoside monophosphates through a reductase-mediated activation process, *Antiviral Res.* **1993**, *22*, 155–174.
5. S. Guijun, Z. Deyu, L. Ning, Z. Junbing, Z. Chunyuan, L. Defen, L. Cuilan, Y. Qian, Z. Yanyu, X. Sujuan, G. Lichuan, Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 725–727.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Anindita Paulina D, Sasaki Michihito, Okada Kazuma, Ito Naoto, Sugiyama Makoto, Saito-Tarashima Noriko, Minakawa Noriaki, Shuto Satoshi, Otsuguro Satoko, Ichikawa Satoshi, Matsuda Akira, Maenaka Katsumi, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Ribavirin-related compounds exert in vitro inhibitory effects toward rabies virus, *Antiviral Res.* 査読有, *154*, **2018**, 1–9.
DOI: 10.1016/j.antiviral.2018.03.011
2. Saito-Tarashima Noriko, Minakawa Noriaki, Unnatural Base Pairs for Synthetic Biology, *Chem. Pharm. Bull.* 査読有, *66*, **2018**, 132–138.
DOI: 10.1248/cpb.c17-00685
3. 田良島 典子, 石井 和貴, 太田 雅士, 林 弘也, 山本 清義, 南川 典昭, 生物学的等価性に重点をおいた化学修飾核酸の創製 - 4'-セノリボヌクレオシドの合成とオリゴマーへの導入 -, 日本核酸医薬学会誌, 査読有, *21*, **2017**, 4–13.
4. Yosuke Igata, Noriko Saito-Tarashima, Daiki Matsumoto, Kazuyuki Sagara, Noriaki Minakawa, A 'catch and release' strategy towards HPLC-free purification of synthetic oligonucleotides using a phosphoramidite unit possessing a photocleavable azide linker, *Bioorg. Med. Chem.* 査読有, *25*, **2017**, 5962–5967.
DOI: 10.1016/j.bmc.2017.09.014
5. Kazuto Shiraishi, Noriko Saito-Tarashima, Yosuke Igata, Keiji Murakami, Yasuko Okamoto, Yoichiro Miyake, Kazuhiro Furukawa, Noriaki Minakawa, Synthesis and evaluation of c-di-4'-thioAMP as an artificial ligand for c-di-AMP riboswitch. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有, *25*, **2017**, 3883–3889.
DOI: 10.1016/j.bmc.2017.05.042
6. Takeo Iwata, Kyoko Kuribayashi, Masahiko Nakasono, Noriko Saito-Tarashima, Noriaki Minakawa, Noriko Mizusawa, Rie Kido, Katsuhiko Yoshimoto, The AMPK/mTOR pathway is involved in D-dopachrome tautomerase gene transcription in adipocytes differentiated from SGBS cells, a human preadipocyte cell line. *Cytokine.* 査読有, *23*, **2017**, 195–202.
DOI: 1016/j.cyto.2017.04.017
7. Noriko Saito-Tarashima, Ota Masashi, Noriaki Minakawa, Synthesis of 4'-selenoribonucleosides, the building blocks of 4'-selenoRNA, using a hypervalent iodine. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 査読有, *70*, **2017**, 1.40.1–1.40.21.
DOI: 10.1002/cpnc.34

[学会発表] (計 1 6 件)

1. Noriko Saito-Tarashima, Noriaki Minakawa, Synthesis and biological potential of modified cyclic dinucleotides, Asian International Symposium The 99th CSJ Annual Meeting (招待講演) (国際学会), 2019.
2. 田良島 典子, 松尾 礼子, 南川 典昭, 4'-チオ核酸により構成されるセントラルドグマの構築、日本薬学会 第 139 年会, 2019.

3. 山田 真由, 和田 知也, 田良島 典子, 南川 典昭, RNA 結合タンパク質捕捉のためのヌクレオシド型ケミカルプローブの開発研究, 日本核酸医薬学会 第 57 回中国四国支部学術大会, 2018.
4. 熊埜御堂 優介, 田良島 典子, 井形 陽佑, 山口 直記, 南川 典昭, 亜リン酸の段階的活性化に基づく環状ジヌクレオチド類合成法の開発, 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2018.
5. 中村 元紀, 岡野 祐貴, 黒澤 まどか, 田良島 典子, 日柴喜 隆行, 加藤 文博, 渡辺 匡史, 藤室 雅弘, 南川 典昭, 抗 Dengue ウイルス活性を有するイミダゾールヌクレオシド類の開発研究, 第 57 回日本薬学会・薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2018.
6. Seigi Yamamoto, Noriko Saito-Tarashima, Naoshi Yamazaki, Tatsuya Fukuta, Kentaro Kogure, Noriaki Minakawa, Development and Evaluation of Photoresponsive DNA Prism with Nucleic Acid Medicine, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2018) (国際学会), 2018.
7. Koki Matsumoto, Noriko Saito-Tarashima, Noriaki Minakawa, Creation of a puDDD: pyAAA H-bonding base pair in DNA oligonucleotide, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2018) (国際学会), 2018.
8. 黒澤 まどか, 日柴喜 隆行, 加藤 文博, 岡野 裕貴, 田良島 典子, 南川 典昭, 渡部 匡史, 藤室 雅弘, 抗 Dengue ウイルス化合物の探索, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018.
9. 田良島 典子, 井形 陽佑, 白石 和人, 古川 和寛, 南川 典昭, mRNA の構造変化を誘起するヌクレオチド誘導体の創製 -c-di-4'-thioAMP の合成とリボスイッチに対する結合親和性評価-, 日本核酸医薬学会 第 4 回年会, 2018.
10. 田良島 典子, 井形 陽佑, 白石 和人, 古川 和寛, 南川 典昭, mRNA の構造変化を誘起する中分子化合物の創製 - c-di-4'-thioAMP の合成とリボスイッチに対する結合親和性評価 -, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 13 回年会, 2018.
11. 田良島 典子, 南川 典昭, 核酸 - タンパク質間相互作用解析のためのケミカルアプローチ, 2017 年度 生命科学系合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会, 第 90 回日本生化学大会) Conbio 2017 (招待講演), 2017.
12. 森田 直道, 田良島 典子, 南川 典昭, 環状ジヌクレオチドミミックの合成と機能評価, 日本薬学会第 138 年会, 2017.
13. 松本 航輝, 与那覇 乙梨恵, 田良島 典子, 南川 典昭, DDD:AAA 型水素結合様式を持つ人工塩基対の合成と性質解析, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2017.
14. 太田 雅士, 石井 和貴, 田良島 典子, 南川 典昭, 4'-セレン RNA の合成並びに性質解析, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2017.
15. 田良島 典子, 和田 知也, 南川 典昭, RNA-タンパク質間相互作用解析のためのケミカルアプローチ, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会, 2017.
16. 和田 知也, 田良島 典子, 南川 典昭, ケミカルプローブ導入 siRNA を用いたパターン認識受容体との相互作用解析, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会, 2017.

[図書] (計 3 件)

1. Noriko Saito-Tarashima, Akira Matsuda, Noriaki Minakawa, *Springer*, Four-hydrogen-bonding base pairs in oligonucleotides: design, synthesis and properties, *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides*, 2018, 147-169.
2. Noriaki Minakawa, Akira Matsuda, Noriko Saito-Tarashima, *Springer*, RNA bioisoster: Chemistry and properties of 4'-thioRNA and 4'-selenoRNA, *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides*, 2018, 233-252.
3. 田良島 典子, 南川 典昭, 化学同人, CSJ Current Review 生命機能に迫る分子化学, 第 16 章 化学修飾 DNA を利用した RNAi 創薬, 2018, 70-78.

[その他]

<https://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/mar/>

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。