

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03509

研究課題名(和文) CD39-CD73 - アデノシンカスケードを制御する分子の探索と創薬への展開

研究課題名(英文) Search for molecules that control the CD39-CD73-adenosine cascade and expand into drug discovery

研究代表者

富岡 佳久 (Tomioka, Yoshihisa)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00282062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1/PD-L1非依存的免疫抑制経路を標的とした新規がん免疫療法の低分子創薬を行うため、CD73またはCD39の酵素活性を阻害あるいは上昇させる化合物を酵素学的評価法並びにマウス脾臓細胞を用いる評価方法を用いて東北大学化合物ライブラリー6,080種をスクリーニングし、評価した結果、19種の有望なシーズ候補化合物を得た。その中の1種の類縁化合物13種についての酵素反応曲線からCD73に選択的な化合物3種を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「腫瘍内微小環境におけるCD39-CD73-アデノシンカスケードを制御することは臨床的がん治療に貢献することができるか?」という問いに対して、東北大学が保有している化合物ライブラリーを活用して、CD39-CD73-アデノシンカスケードをモジュレートする分子を酵素学的方法および免疫学的評価方法に基づいて探索・取得し、構造展開した結果、CD73に選択的な3種類の創薬リード化合物を得ることに成功し、更なる創薬研究に繋げることが可能となったところに学術的独自性と社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic evaluation methods and enzymatic evaluation methods for compounds that inhibit or increase the enzymatic activity of CD73 or CD39 for the small molecule discovery of novel cancer immunotherapy targeting the PD-1 / PD-L1 independent immunosuppressive pathway. As a result of screening and evaluating 6,080 species of the Tohoku University compound library using the evaluation method using mouse spleen cells, 19 promising seed candidate compounds were obtained. We succeeded in obtaining three compounds selective for CD73 from the enzyme reaction curves of one of the 13 analog compounds.

研究分野：腫瘍薬学

キーワード：CD73 CD39 inhibitors compound library

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CD73 (EC: 3.1.3.5) は、5' -ヌクレオチダーゼの一種で、GPI アンカー酵素として知られ、通常 AMP (ヌクレオチド) からアデノシン (ヌクレオシド) を生成する反応を触媒する。CD39 (EC: 3.6.1.5) は、アピラーゼとして知られ、ATP からのリン酸、ADP からのリン酸の加水分解反応を触媒し AMP を生成する。従って、CD39 と CD73 は、細胞外 ATP 量、さらに細胞外の ADP 量、AMP 量、アデノシン量の制御に重要な酵素であると考えられる。

我々は、臓器障害マーカー候補である血中・尿中に存在する 1 -メチルアデノシン (1mA; 主に t-RNA に由来する) の生成機序を検討する中で、ヌクレオチドからヌクレオシドに変換する酵素に注目し、樹立培養がん細胞における CD73 の発現を調べ始めたところ、細胞によってその発現量が異なることに気がついた。免疫チェックポイント分子の一つである PD-L1 の発現量を同様に調べたところ、これも細胞によって異なっていた。臨床において、PD-1 や PD-L1 などの免疫チェックポイント分子を標的とするがん免疫療法が期待される中で、患者層別化が重要であることが理解されていることから、この CD73 発現量も患者層別化に寄与するとともに治療標的になると考えられた。先行研究において、CD73 阻害薬が異系ドナー T 細胞輸注療法における移植片対腫瘍効果を増強し、悪性リンパ腫の再発を抑制することを明らかにしていた (Tsukamoto, H. et al., Blood, 119: 4554-4584, 2012)。

改めて文献等の調査を行うと、CD73 を標的とする治療抗体 (MEDI9447, BMS-986179, CPI-006) の治療が進んでいる一方で、CD73 酵素活性を標的とする低分子化合物として 5'-(2,6-dimethylene)diphosphate adenosine (APCP) などのプリンアナログなどは報告されているものの、臨床に資することできる有望な化合物が未だ見つかっていないことが明らかであった。また、血中 CD73 が、抗 PD-1 抗体治療成否のバイオマーカー候補として挙がってきていた。そのような背景において、CD73 を標的とする低分子化合物は、抗体医薬品とは異なる薬物動態・薬力学となることが期待され、これらを組み合わせる新規療法により、進行中の臨床的 CD73 阻害療法を補強することが期待できると考えられた。

そこで、創薬を出口とし、まずは東北大学化合物ライブラリーから非プリン化合物の CD73 3 活性に影響する化合物を得ることを計画した。併せて、CD39 の活性に影響する化合物探索についても計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、東北大学化合物ライブラリーから CD73 あるいは CD39 の酵素活性に影響を与える化合物をスクリーニングし、創薬シーズ化合物としての評価を行うことにある。すなわち、CD73 および CD39 の酵素活性評価系など生物活性の評価系を構築しながら、CD73 あるいは CD39 の酵素活性を阻害あるいは上昇させる化合物のライブラリースクリーニングしたのち、ライブラリースクリーニングで得られた候補化合物をリード化合物として有機化学的等によって構造展開し、ライブラリー化合物を基にしたより創薬につながるシーズ化合物を得ることを計画した。

3. 研究の方法

CD73 および CD39 の酵素活性評価系の確立

CD73 および CD39 のリコンビナントタンパク質を用いて基質となるヌクレオチドの代謝活性を評価する系を確立した。

CD73 あるいは CD39 の酵素活性を阻害あるいは上昇させる化合物のライブラリースクリーニング

創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の支援を受け提供された東北大学化合物ライブラリーに対して、構築した酵素評価系を用いて、CD73 および CD39 の酵素活性に影響する化合物酵素のスクリーニングを行った。

マウス脾臓細胞を用いる評価系の構築

候補化合物の免疫系に与える影響を評価するために、マウス脾臓細胞を抗 CD3/CD28 抗体で共刺激したときの T 細胞増殖誘導への影響を指標として行った。

ライブラリースクリーニングで得られた化合物をリード化合物として有機化学的等によって構造展開し、酵素活性を指標とする構造最適化の検討

候補化合物をリード化合物から類縁化合物へ構造展開し、酵素活性を指標とする構造最適化の検討を行った。

4. 研究成果

CD73 および CD39 の酵素活性評価系の確立

CD73 および CD39 のリコンビナントタンパク質を用いて基質となるヌクレオチドの代謝活性を評価する系を確立した。CD73 は GPI アンカーにより膜と結合する構造をとり、ホモ二量体の膜結合型と可溶型の二種類の形態がある。また、その酵素活性には亜鉛イオンの存在が必要であることが知られる。そこでマウス及びヒト CD73 の GPI アンカー部分を His タグに置換した可溶型 CD73 を分泌する細胞を構築し、その培養上清を回収してニッケルカラムを用いたアフィニティ精製を行った。溶出はイミダゾールによるグラジエント溶出法を行い、CD73 を分画・精製した。精製したマウス CD73 の酵素活性をマラカイトグリーン遊離リン酸測定試薬を用いて評価した。リン酸溶液標品を調整し、マラカイトグリーンと反応させることで検量線を作成した(図1)。その結果、リン酸濃度 0.5-25 $\mu\text{mol/L}$ 間で直線性を確認した。酵素と基質の反応時間を決定するために初速度を測定したところ、反応時間 15 分までにおいて直線性が確認された(図2)。以上から、酵素と基質の反応時間を 12 分とした。

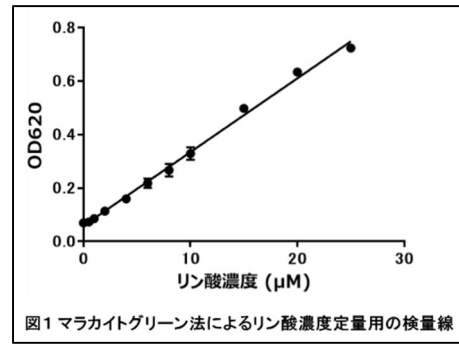


図1 マラカイトグリーン法によるリン酸濃度定量用の検量線

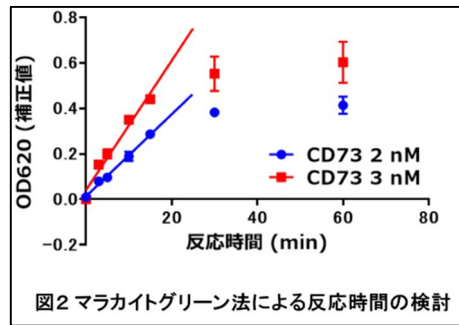


図2 マラカイトグリーン法による反応時間の検討

マウス CD73 と各モノヌクレオチドとの反応を評価し、 K_m 値と V_{max} 値を算出した(表1)。その結果、評価した AMP、GMP、CMP、UMP、IMP を基質とすることが明らかになった。特にプリン系モノヌクレオチドへの親和性が高いことが確認された。

表1 マウスCD73と各ヌクレオチドとの反応性

基質	K_m (95%信頼区間) [μM]	V_{max} (95%信頼区間) [nmol/min/ μg]
AMP	12.8 (10.9 - 14.6)	16.3 (15.9 - 16.7)
GMP	11.9 (9.62 - 14.3)	9.59 (9.29 - 9.89)
CMP	23.3 (20.4 - 26.2)	11.0 (10.7 - 11.3)
UMP	19.1 (14.9 - 23.2)	21.6 (20.6 - 22.5)
IMP	16.3 (13.5 - 19.0)	12.7 (12.3 - 13.1)

CD73 阻害薬である APCP(adenosine 5'-(β , γ -methylene)diphosphate)を用いて、酵素の阻害様式を評価したところ、3 $\mu\text{mol/L}$ APCP では、 V_{max} 値に影響せず K_m 値が上昇する競合的阻害様式となることを確認できたことから、構築した CD73 酵素評価系が十分であることが示された。

CD73 あるいは CD39 の酵素活性を阻害あるいは上昇させる化合物のライブラリースクリーニング

創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の支援を受け提供された東北大学化合物ライブラリーに対して、構築した酵素評価系を用いて、CD73 および CD39 の酵素活性に影響する化合物酵素のスクリーニングを行った。すなわち、提供された化合物 6,080 種のそれぞれについて、化合物 (10 $\mu\text{mol/L}$) を CD73 (3 nmol/L) と AMP (20 $\mu\text{mol/L}$) の反応系に添加した場合の阻害率を求めた。一次スクリーニングは、APCP (10 $\mu\text{mol/L}$) の 30% 阻害率値を基準として行い、次いで化合物濃度を 3 $\mu\text{mol/L}$ として二次スクリーニングを行った結果、19 種類の候補化合物を得た。

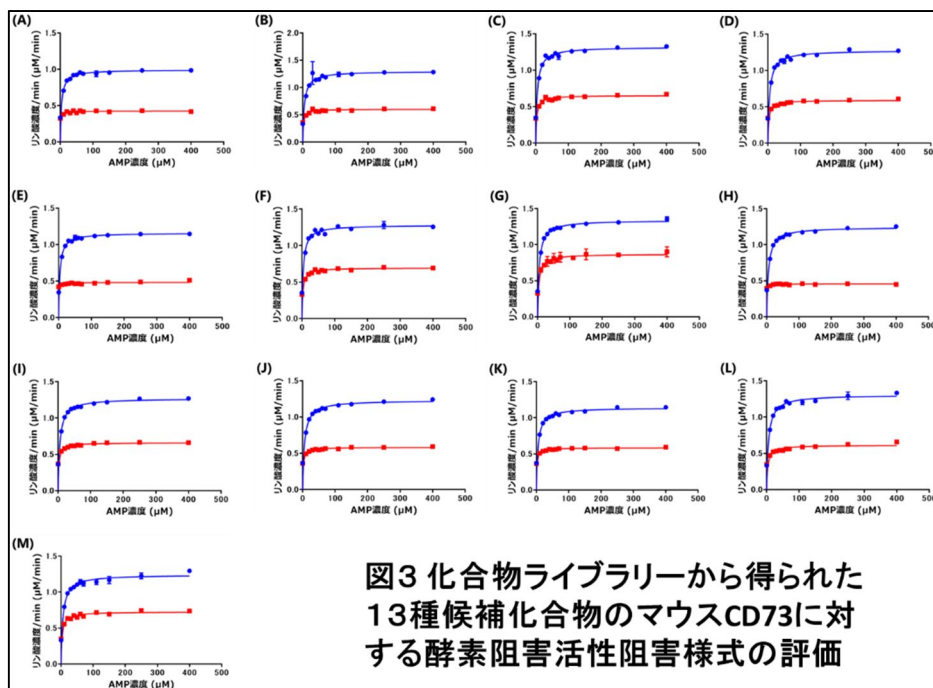


図3 化合物ライブラリーから得られた13種候補化合物のマウスCD73に対する酵素阻害活性阻害様式の評価

得られた 19 種類の化合物について特異性評価として、アルカリホスファターゼ (ALP) に対する影響を評価した。ALP は、パラニトロフェニルリン酸の脱リン酸化反応によるパラニトロフェノールの生成を 405nm の吸光度を指標に行った。その結果、19 種類の化合物すべてにおいて、阻害率が 10% 以下であった。さらに特異性評価として CD39 の酵素活性への影響を確認すること

とし、CD39 (50ng/mL) と ATP (50 $\mu\text{mol/L}$) の反応系に化合物 (10 $\mu\text{mol/L}$) で添加した際の阻害率を求めたところ、3 種の化合物で 10% を超えた。これまでの結果より、有望な候補化合物が得られていると考え、BINDS にこの 19 種類の構造開示を請求した。

構造開示後に評価し、非プリン系化合物 13 種を CD73 活性に影響する化合物として継続して評価することとし、ヒト CD73 を用いて酵素反応曲線による阻害様式を決定した。その結果、13 種すべてにおいて競合阻害非依存的阻害様式であることを確認した (図 3)。

マウス脾臓細胞を用いる評価系の構築

候補化合物の免疫系に与える影響を評価するために、Ly5.1 マウス脾臓細胞を抗 CD3/CD28 抗体で共刺激したときの T 細胞増殖誘導への影響を指標として行った。はじめに、マウス脾臓細胞を抗 CD3/CD28 抗体で共刺激時に AMP を加えると T 細胞増殖が抑制された。また、そこに CD73 阻害薬である APCP を加えると、T 細胞増殖の抑制が解除された。同様に、OT-I (MHC クラス I 拘束性に OVA ペプチド断片に反応する TCR 組み換えマウス) においても、OVA ペプチドによる CD8 陽性 T 細胞増殖の誘導と AMP によるその抑制効果、さらには APCP を加えた時の CD8 陽性 T 細胞増殖抑制の回復が確認された。なお、OT-I マウス脾臓細胞において、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞のそれぞれに CD73 が発現していることを確認した。以上の評価系を用いて、上記過程で候補化合物とした 13 種についてリンパ球増殖反応を指標に評価を行った。陽性対象化合物として APCP を使用した。その結果、13 種 (10 $\mu\text{mol/L}$) のうち、化合物 # 1 だけが AMP による抑制効果を回復させることが明らかとなった (図 4)。また、この回復効果は、濃度が 5 $\mu\text{mol/L}$ のときには不明瞭となった。なお、いくつかの候補化合物は AMP の抑制よりも遙かに生細胞数が少なくなったことから、化合物固有の細胞毒性による影響も否定できないと考えられた。

化合物 #1 は、競合阻害非依存的阻害様式であるため、競合阻害様式である APCP との併用効果を評価した。その結果、それぞれ単独で用いたときより阻害効果が増強されることが明らかとなった (図 5)。

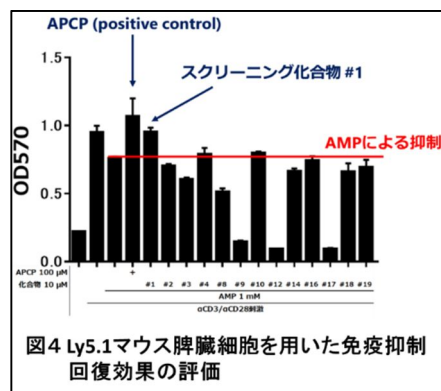


図4 Ly5.1マウス脾臓細胞を用いた免疫抑制回復効果の評価

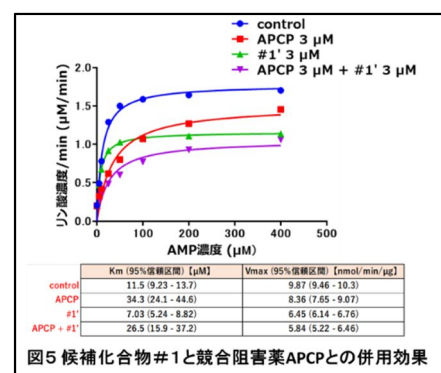


図5 候補化合物 #1 と競合阻害薬 APCP との併用効果

ライブラリースクリーニングで得られた化合物をリード化合物として有機化学的等によって構造展開し、酵素活性を指標とする構造最適化の検討

化合物 #1 について、CD39 に対する阻害活性あるいは ALP に対する阻害活性を評価したところ、CD39 に対してはわずかな阻害作用を有すること (図 6 左側) そして ALP に対しては、大きな阻害作用を有することが明らかになった (図 6 右側)。

そこで化合物 #1 をリード化合物として類縁化合物へ構造展開し、酵素活性を指標とする構造最適化を検討することとした。はじめに化合物 #1 の類縁構造物を化合物データベースや試薬カタログから抽出 (100 化合物) し、その構造を精査し、13 種の類縁化合物を初回検討化合物とした (図 7)。これまでと同様にヒト CD73 の酵素活性に対する影響をマラカイトグリーン法で評価したところ、類縁化合物 No. 5、No. 28、No. 74 の 3 種において、化合物 #1 よりも高い CD73 酵素活性阻害効果を見出した (図 8)。これら類縁化合物 3 種について、同様に ALP 活性に対する阻害率を評価したところ、No. 28 と No. 74 においては ALP を

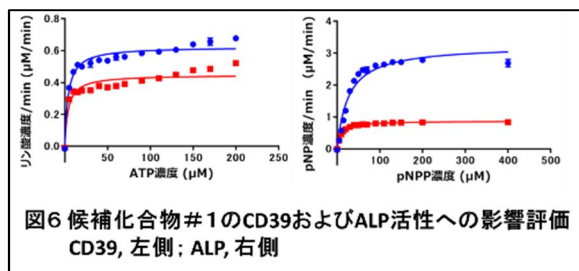


図6 候補化合物 #1 の CD39 および ALP 活性への影響評価 CD39, 左側; ALP, 右側

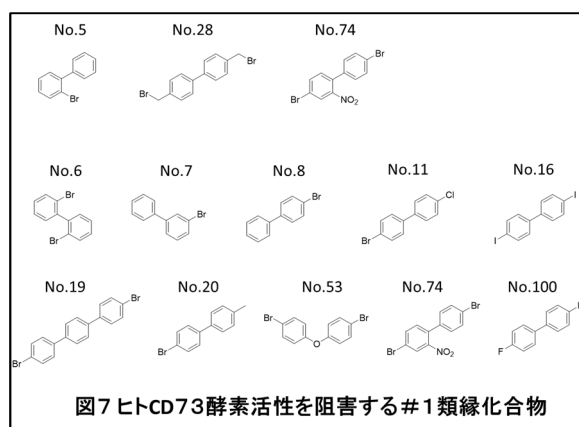


図7 ヒト CD73 酵素活性を阻害する #1 類縁化合物

ほぼ阻害しないことが示唆された。特異性評価に関しては、今後、その他の脱リン酸化酵素についての検討や更なる構造最適化の検討が必要であるものの、CD73 阻害活性と特異性が共に高い創薬リード化合物を得ることに成功したものとする。今後、#1 以外の化合物ライブラリーから得られた候補化合物の類縁化合物への構造展開と評価を継続し、さらなる候補化合物の取得

成功に繋がりたいと考えている。

以上より、東北大学化合物ライブラリーからCD73あるいはCD39の酵素活性に影響を与える化合物をスクリーニングし、創薬シーズ化合物としての各種評価と構造展開を実施した結果、創薬につながるシーズ候補化合物を得ることに成功した。

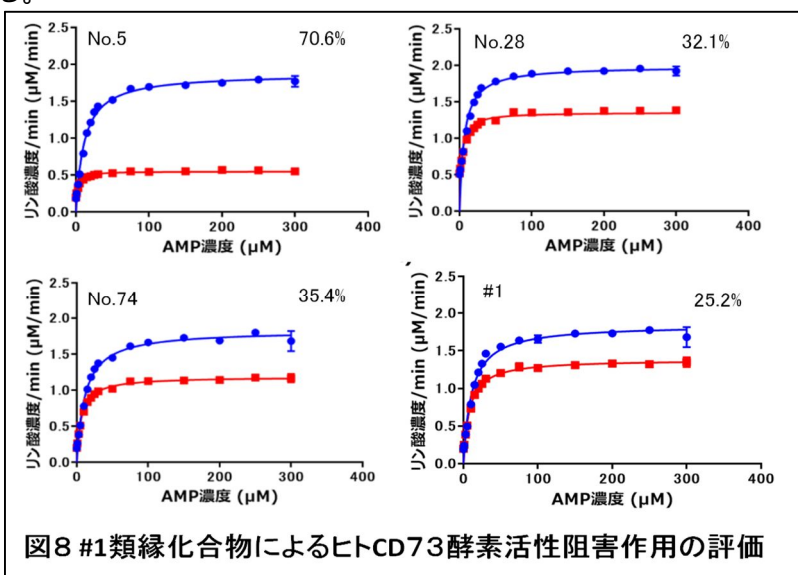


図8 #1類縁化合物によるヒトCD73酵素活性阻害作用の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤裕徳、金光祥臣、桑原義和、福本学、塚本宏樹、富岡佳久
2. 発表標題 Peroxiredoxin 4は臨床的放射線耐性口腔扁平上皮癌細胞の耐性能に寄与する
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村隆太郎、松本洋太郎、塚本 宏樹、金光祥臣、富岡佳久
2. 発表標題 CKD評価法に用いる蛍光標識フェニルサルフェートの合成
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平本航大、渡辺匠、松本洋太郎、塚本宏樹、富岡佳久
2. 発表標題 安定同位体内標準物質を用いた修飾核酸一斉定量系の構築
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	塚本 宏樹 (Tsukamoto Hiroki) (70423605)	国際医療福祉大学・福岡薬学部・准教授 (32206)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秋山 泰利 (Akiyama Yasutoshi) (70635557)	東北大学・薬学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	松本 洋太郎 (Matsumoto Yotaro) (90420041)	東北大学・薬学研究科・講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関