

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15482

研究課題名（和文）APサイト修復阻害を基にした抗がん効果増強剤の開発

研究課題名（英文）Development of anticancer drug based on AP site repair inhibition

研究代表者

阿部 由紀子（Abe, Yukiko）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：40586856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではAPサイト修復阻害に基づく新規抗がん剤および抗がん効果増強剤の開発を行った。本研究期間を通じてチオグアニンリガンドの設計と合成を行い、その化学的性質を明らかにした。また、APサイトを有する短鎖人工核酸を用いてチオグアニンリガンドによるAPサイト部位特異的切断能を評価し、リガンドがAPサイト認識後、部位特異的に切断し、かつ共有結合を形成する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して開発したチオグアニンリガンドは、代表的なDNA損傷の一つであるAPサイトを特異的に認識し、APサイト部位での切断を促進する。更には、APサイトの切断産物と共有結合を形成する事で、APサイト修復を阻害すると期待される。本リガンドはAPサイト修復阻害に基づく新規抗がん剤および既存抗がん剤との併用による抗がん効果増強剤として有用なツールとなりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigate the new AP site-binding ligands having thioguanine unit and polyamine unit. the thioguanine ligands formed the hydrogen bonding with complementary cytosine base and stabilized the duplexes having AP sites analogue. In the experiments of thioguanine ligand using the duplexes having AP sites, it was indicated that the thioguanine ligands promoted the cleavage of AP sites by b-elimination followed by formed the covalent bond with the b-eliminated product of AP sites. We expect that the adducts of thioguanine ligand with the b-eliminated product to work as the 3'-block and that the blockage or modulation of the AP site repair pathway may enhance the antitumor efficacy of DNA alkylating agents in combination with the thioguanine ligands.

研究分野：有機化学

キーワード：APサイト修復阻害 共有結合形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 中の核酸塩基の酸化やアルキル化は、高い変異原性を有する DNA 損傷の一つであり、細胞内では脱塩基部位（AP サイト）と呼ばれる中間体を經由して修復される。抗がん剤の多くは DNA 中にアルキル化塩基を生成し抗がん効果を発揮するが、アルキル化塩基の修復途中で生じる AP サイトの細胞毒性もまた抗がん効果の一因である。そのため、AP サイトの修復を阻害する物質は、そのものが新規抗がん剤としての可能性を秘めているとともに、既存抗がん剤との併用により抗がん効果を増強するツールとなりうると期待されている。近年では、AP サイト修復に主要な役割を果たす AP エンドヌクレアーゼ（APE1）の AP サイトへの結合を阻害する分子が新規抗がん剤になりうるといふ研究報告がある。

申請者が開発した AP サイト特異的リガンド（図 1）は、核酸塩基とポリアミンの結合体であり AP サイトに対して塩基特異的に結合する。本リガンドの核酸塩基部が相補塩基を失った 2 本鎖 DNA 中の核酸塩基と AP サイト内で G : C および A : T の相補的なワトソン-クリック塩基対を再現する。更には、DNA リン酸部との非特異的な静電的相互作用により核酸塩基部の塩基対形成を補助するポリアミン部は、AP サイトを有する DNA 鎖に近接する事で、AP サイトの 3'側でβ-脱離を促進し AP サイト部位特異的な 1 本鎖切断を引き起こす。AP サイトを有する DNA 鎖のβ-脱離断片は末端にα,β-不飽和アルデヒドを有しており、これは AP サイトの正常な修復と続く複製を阻害する 3'-ブロックとなる。このため、本リガンドによる AP サイトの特異的認識と切断は通常の AP サイト修復を阻害または遅延させる可能性を秘めており、AP サイト修復阻害に基づく新規抗がん剤および抗がん効果増強剤への展開が期待された。

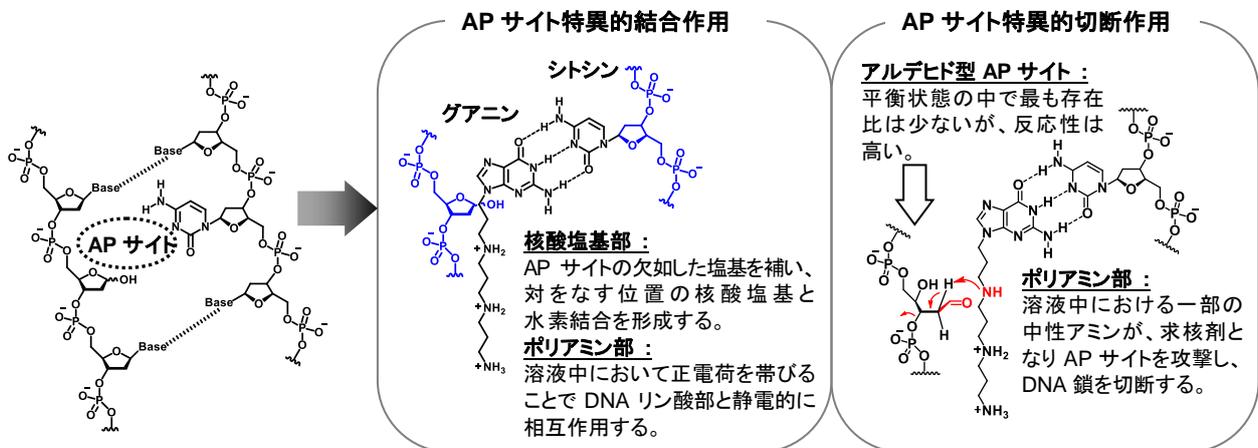
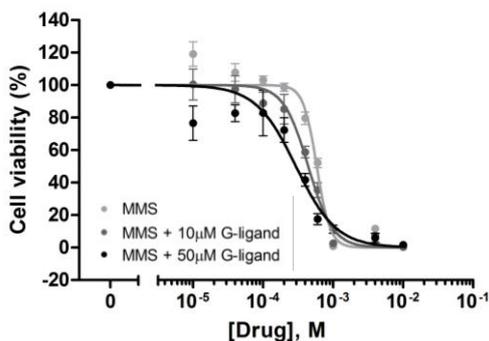


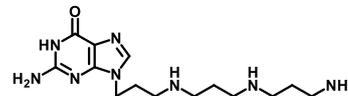
図 1 AP サイト特異的リガンドの構造と特性

培養細胞を用いた予備検討から、核酸塩基部にグアニンを有するリガンド（G-ligand）は DNA アルキル化剤であるメタンスルホン酸メチル（MMS）との併用によりわずかではあるものの MMS 単独よりもその IC<sub>50</sub> 値を小さくする事が示された（図 2）。しかし G-ligand 単独ではほとんど細胞毒性効果を示さず、MMS 併用における IC<sub>50</sub> 値も μM オーダーであった。



#### G-ligand :

核酸塩基としてグアニンをもち、高い水素結合能およびスタッキング相互作用を持つ。



#### IC<sub>50</sub> 値

	MMS 単独	G-ligand	
		+10 μM	+50 μM
A549	585.5 μM	442.2 μM	295.2 μM

Cell viability and IC<sub>50</sub> values were determined with curve-fitting analysis (nonlinear regression curve, variable slope) provided by GraphPad Prism4 software.

図 2 G-ligand の MMS に対する相乗的な細胞毒性効果

### 2. 研究の目的

本研究では、開発したリガンドの AP サイト特異的な結合と切断の性質を応用し、AP サイト修復阻害を基にした新規抗がん剤および抗がん効果増強剤を開発開発する事を目的とする。本研究において開発する AP サイト特異的リガンドはがん疾患に対してだけでなく、DNA 損傷と修復に関しても様々な知見が得られると考えられ、今後の医療および AP サイト研究において有用なツールとなると期待される。

### 3. 研究の方法

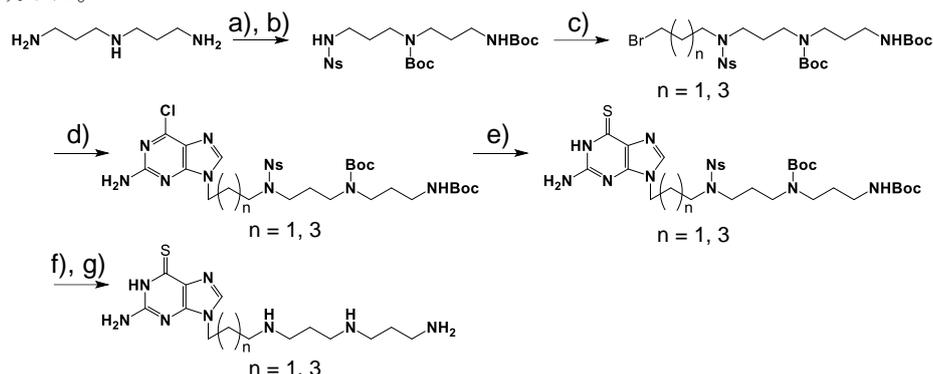
本研究課題では、より効率的に結合および切断を引き起こす新規リガンドとして、リガンドと DNA 鎖間で共有結合を形成するリガンドを設計合成し、AP サイトを有する DNA 鎖との親和性および切断能を検討した。

これまで開発してきたリガンドは、水素結合、スタッキング相互作用および静電的相互作用などの非共有結合により AP サイトの特異的認識を達成していた。しかし、APE1 との競合実験や予備的な *in vitro* 細胞実験の結果から、AP サイトに対するより強い結合親和性が必要である事が示された。そこで、核酸塩基部にチオグアニンを有する新規リガンド ( $sG$ -ligand) を設計した。チオグアニンは 365 nm の光により活性化され 6 位チオカルボニル部位がチミン塩基の 5, 6 位二重結合と強固な共有結合を形成する事が知られている。このため、 $sG$ -ligand は天然核酸塩基を有する従来のリガンドよりも共有結合形成による大きな安定化効果が得られ、続く部位特異的な切断も効率的に起こると期待した。 $sG$ -ligand の AP サイトに対する結合特性については、AP サイトにおいて切断が起こらない安定な AP サイトアナログを有する短鎖 ODN2 本鎖を用いて、リガンド非存在下および存在下における融解温度測定を行い評価した。また、光照射による共有結合形成反応を HPLC で追跡し、HPLC 分析で新たに確認されたピークを回収し MALDI-TOF/MS で質量分析を行う事でリガンド付加体の確認を行った。

更に、AP サイトを有する短鎖 ODN2 本鎖に対する部位特異的な切断についてもゲル電気泳動および HPLC を用いて経時的に分析し、 $sG$ -ligand の AP サイト切断効率についても評価した。光照射反応についてもゲル電気泳動および HPLC を用いて分析し、リガンドが促進する  $\beta$ -脱離により生じた ODN 断片の解析を MALDI-TOF/MS により行った。

### 4. 研究成果

(1) チオグアニンを有する新規リガンドは、グアニンリガンド合成を基に 7 工程で合成した (スキーム 1)。チオグアニンが AP サイトに挿入されたのち、近傍のチミン塩基と共有結合を形成する事を考慮し、核酸塩基部とポリアミン部を繋ぐ炭素リンカーについて炭素数 3 および 5 のものを合成した。



a) b) c.f. Abe Y. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, **20**, 3470-3479 c) n = 1; 1,3-dibromopropane,  $K_2CO_3$ , dry DMF, rt, 74%, n = 3; 1,5-dibromopentane,  $K_2CO_3$ , dry DMF, rt, 93% d) 2-amino-6-chloropurine,  $K_2CO_3$ , dry DMF, 0 °C  $\rightarrow$  rt, n = 1; 82%, n = 3; 74% e) thiourea, EtOH, reflux, n = 1; 73%, n = 3; 80% f) thiophenol,  $K_2CO_3$ , dry DMF, rt, n = 1; 94%, n = 3; 91% g) 0.5M HCl/MeOH, rt, n = 1; quant., n = 3; 78%

#### スキーム 1 チオグアニンリガンドの合成

(2) リンカーの炭素数 3 のリガンド ( $sG$ -ligand(C3)) および炭素数 5 のリガンド ( $sG$ -ligand(C5)) それぞれについて、リガンドの有無における短鎖 ODN2 本鎖の融解温度測定を行った。本実験では AP サイトとして安定アナログであるテトラヒドロフラン環 (F) を用い、相補塩基 (Z) はシトシンとした。相補鎖の 5'側 (X<sub>2</sub>) または 3'側 (Y<sub>2</sub>) および両側にチミンを有する 3 種の配列 (Duplex 1, 2, 3) を用いて評価した。チオグアニンはグアニン同様にシトシンと水素結合を形成する事が知られており、3 種全ての 2 本鎖に対してリガンドによる安定化効果がもたらされ、特に Duplex 1 において顕著な効果が得られた (表 1)。

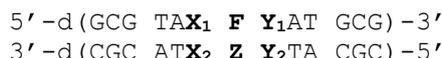


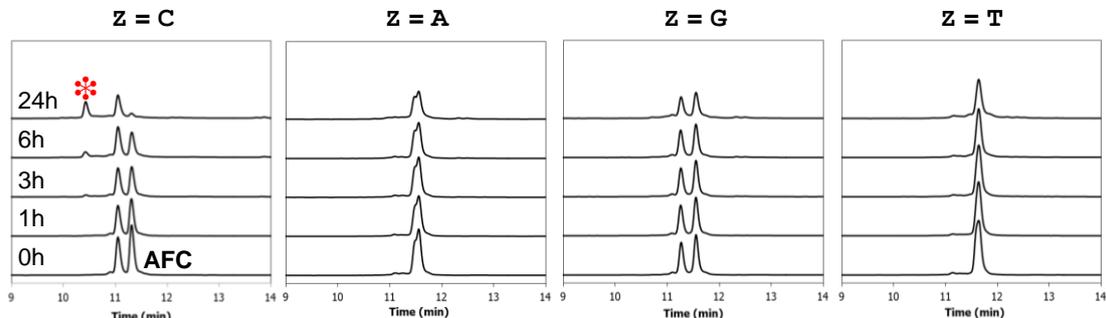
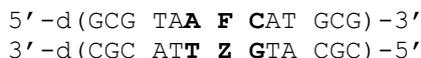
表 1  $\Delta T_m$  値 (°C)

	Duplex1	Duplex2	Duplex3
X <sub>1</sub> : F : Y <sub>1</sub>	AFC	CFA	AFA
X <sub>2</sub> : Z : Y <sub>2</sub>	TCG	GCT	TCT
$sG$ -ligand(C3)	<b>+5.5</b>	+4.3	+2.4
$sG$ -ligand(C5)	<b>+2.9</b>	+2.1	+1.0

UV-melting curves were measured in 10mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.0) containing 100mM NaCl at a scan rate of 1°C at 260 nm in the absence and presence of  $sG$ -ligands. [duplex ODNs]: 2 $\mu$ M, [ $sG$ -ligands]: 20 $\mu$ M.

Duplex 1 と  $sG$ -ligand について、光源、添加物等種々の光反応条件を検討した結果、365 nm

(4W) の光をジチオスレイトール (DTT) 存在下 24 時間照射する事で光反応が進行する事を明らかにした。本光反応における反応性は<sup>s</sup>G-ligand(C3)の方が<sup>s</sup>G-ligand(C5)より優れており、当初の予想とは異なり隣接チミン塩基を有する相補鎖 (X<sub>2</sub>:C:Y<sub>2</sub>)ではなく、AP サイトアナログを有する ODN 鎖 (X<sub>1</sub>:F:Y<sub>1</sub>) と<sup>s</sup>G-ligand が反応している事が HPLC 分析から示唆された。Duplex 1 と<sup>s</sup>G-ligand(C3)の光反応について詳細を明らかにするために、AP サイトアナログの相補塩基 (Z) をアデニン、グアニン、チミンに変更し同様の光反応を行った。その結果、AP サイトアナログの相補塩基 (Z) がシトシンの時のみ反応が進行する事を明らかにした (図 3)。



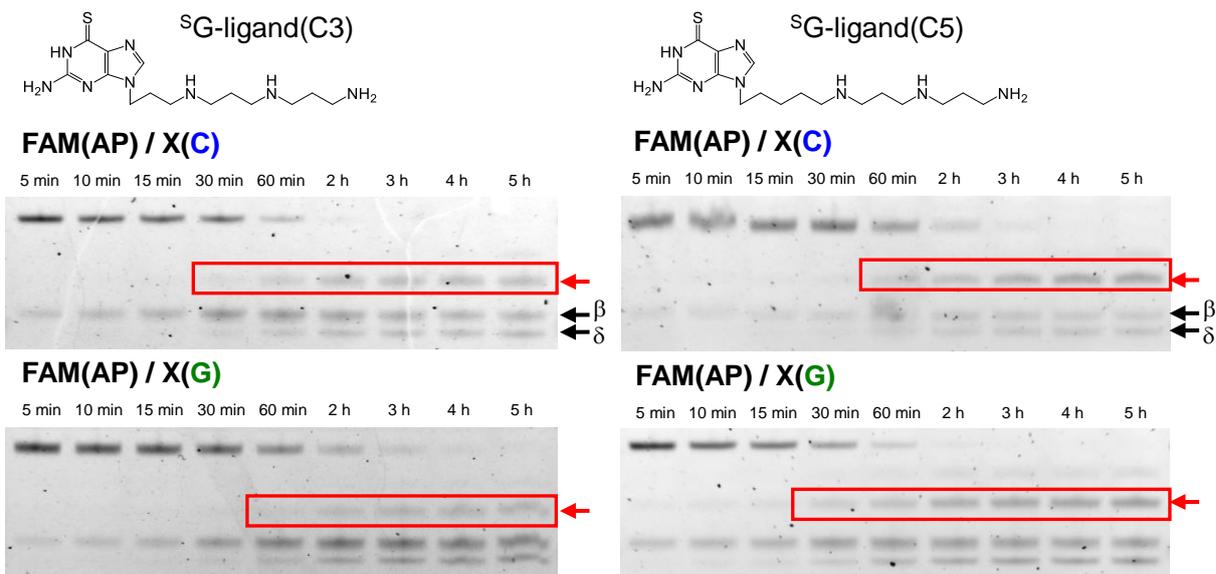
HPLC conditions:

Column : Waters X Bridge C18 3.5 um 4.6 x 150 mm; column oven : 50°C; UV monitor : 254 nm; flow rate : 1 ml/min; solvent : A) 0.1M TEAA buffer (pH7.0), B) MeCN; B conc. : 4-14%/15 min

図 3 <sup>s</sup>G-ligand(C3) の AP サイトアナログを有する ODN 鎖 2 本鎖との光反応

確認された新規ピーク (\*) を単離・精製し、質量分析を MALDI-TOF/MS を用いて行ったところ、AFC 配列にリガンドユニットが結合した分子量と一致する MS が検出された。しかし MALDI-TOF/MS を用いた質量分析からは<sup>s</sup>G-ligand(C3)の結合位置に関する詳細な情報は得られないため、酵素加水分解や LC-MS/MS による解析を検討したが、詳細解明には至らなかった。本反応はチオカルボニル部位を持たない G-ligand では進行しなかった事から、光反応による共有結合形成にチオカルボニル部位が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

(3) また、<sup>s</sup>G-ligand による AP サイト切断についてゲル電気泳動を用いて評価した。本反応では 5'末端を FAM で標識した AP サイトを有する 30 mer の ODN を基質として、AP サイトの相補塩基 (X) にアデニン、グアニン、シトシン、チミンを持つ 4 種の ODN2 本鎖を用いた。<sup>s</sup>G-ligand(C3) および<sup>s</sup>G-ligand(C5) 両方において相補塩基 (X) にかかわらず AP サイトのβ-脱離促進が観察され、更にβ-脱離断片より泳動度の小さいバンドが新たに確認された。



The reaction was performed using 100nM duplexes at 37°C in the presence of 10μM <sup>s</sup>G-ligands and the products were resolved by 12% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis containing 8 M urea at 25 mA for 40 min. The gel was visualized by FAM fluorescence using LAS-4000.

図 4 <sup>s</sup>G-ligand の AP サイトを有する ODN 鎖 2 本鎖に対する切断効果

特に相補塩基 (X) がシトシンおよびグアニンの場合においてバンドが明確に観察され、光照射

なしに AP サイトを有する ODN 鎖と <sup>s</sup>G-ligand が相互作用した事が示唆された (図 4)。照射条件においても同様にゲル電気泳動で反応追跡を行ったが、<sup>s</sup>G-ligand のβ-脱離促進による切断反応は光による共有結合形成反応より速く進行し、光産物を明確にはできなかった。

AP サイトを有する ODN 鎖 (FAM(AP)) とその相補鎖 (X(C)) に対する <sup>s</sup>G-ligand の反応を HPLC で追跡し、各ピークを分取後 MALDI-TOF/MS により解析した結果、AP サイトのβ-およびδ-脱離断片に混じり AP サイトのβ-脱離断片に <sup>s</sup>G-ligand ユニットが結合した分子量とほぼ一致する質量ピークが確認された (図 5)。

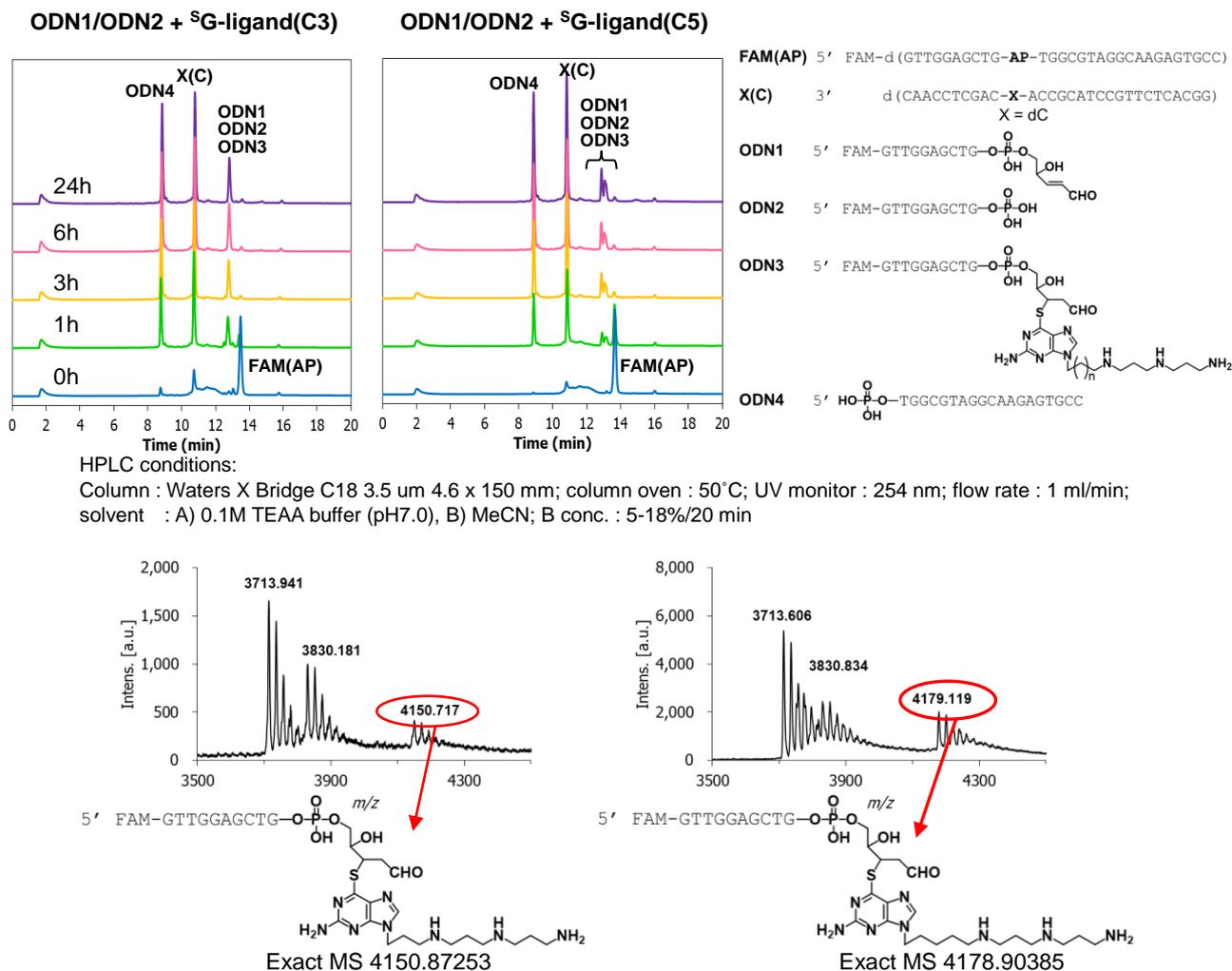


図 4 <sup>s</sup>G-ligand による AP サイト切断反応の経時変化および断片の MALDI-TOF/MS 解析

これらの結果から、ゲル電気泳動による分析で観察された新しいバンドは AP サイトのβ-脱離断片が <sup>s</sup>G-ligand のチオカルボニル部位と共役付加により共有結合を形成したりリガンド付加断片である可能性が示唆された。しかし、チオカルボニルを持たない G-ligand においてもわずかではあるものの同様の付加体と一致する質量ピークが確認されており、この事からβ-脱離断片との共有結合形成はチオカルボニル部位だけでなく、<sup>s</sup>G-ligand および G-ligand に共通する 2 位アミノ基でも起こっていると考えられる。また、<sup>s</sup>G-ligand(C3) と <sup>s</sup>G-ligand(C5) の反応性を比較すると、ゲル電気泳動、HPLC 分析、MALDI-TOF/MS 解析よりわずかに <sup>s</sup>G-ligand(C5) の方が高いと考えられる。これは、AP サイト内でのチオグアニン部の自由度が影響していると考えられる。本研究で開発した新規 <sup>s</sup>G-ligand は AP サイトを有する ODN と照射なしに共有結合を形成しβ-脱離断片末端にリガンドユニットを付加する事から、より強固な 3' ブロックとなると考えられ、本研究の目的とする AP サイト修復阻害を基にした新規抗がん剤および抗がん効果増強剤への展開にあたり有用であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

ホームページ等

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織