

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14358

研究課題名(和文) ENPP1を標的とした分子標的プロドラッグ基盤技術の開発研究

研究課題名(英文) Development of molecular-targeting prodrug for ENPP1

研究代表者

川口 充康 (Kawaguchi, Mitsuyasu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師

研究者番号：10735682

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)：ENPP1が生細胞においてmGMP基を特異的に認識し加水分解する活性を持つことを見出していたため、承認抗がん剤にmGMP基を付与しENPP1を過剰発現する細胞においてのみ細胞毒性を示す化合物の開発を目指した。ただし、SN-38のプロドラッグ化を試みたところmGMP基の合成上の不安定性が明らかとなった。これまでの研究背景を鑑みるとプロドラッグ化する水酸基の酸性度が合成の鍵になると考えられた。反応条件を検討した結果、TGに比べて酸性度の低いクマリン(SN-38と同程度の酸性度を持つ)でもmGMP化できることが明らかとなり、様々なフェノール性水酸基のmGMP化が可能である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではENPP1 (ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1)という細胞外に触媒ドメインを持つ膜タンパク質に着目し、その酵素活性を利用したプロドラッグ技術の開発を目指す。ENPP1は悪性度の高い脳腫瘍や乳がんが発現量が著しく高いことが示され、がん幹細胞性の獲得・維持に必要であることが報告されているため、ENPP1を標的とすることは「がん幹細胞を標的」とすることとなり、神経膠芽腫やトリプルネガティブ乳がんなど悪性度が高く、有効な治療法の乏しいがんに対して効果的かつ副作用の少ない治療法を提案できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Because I found that ENPP1 specifically recognizes and hydrolyzes mGMP groups in living cells, I tried to apply mGMP group to the approved anticancer drug and aimed to develop a compound that shows cytotoxicity in ENPP1 overexpressing cells. However, when we attempted to prodrug SN-38, it was found that the mGMP group was unstable on the synthesis. Considering the background of previous studies, the acidity of the prodrug group is considered to be a key factor in the synthesis of the prodrug. In the result of an investigation of reaction conditions, it was found that coumarin, which is less acidic than TG, is also possible to synthesize Cou-mGMP. By using this reaction condition, I think that I can synthesize various prodrug compounds having mGMP group.

研究分野：創薬化学

キーワード：プロドラッグ

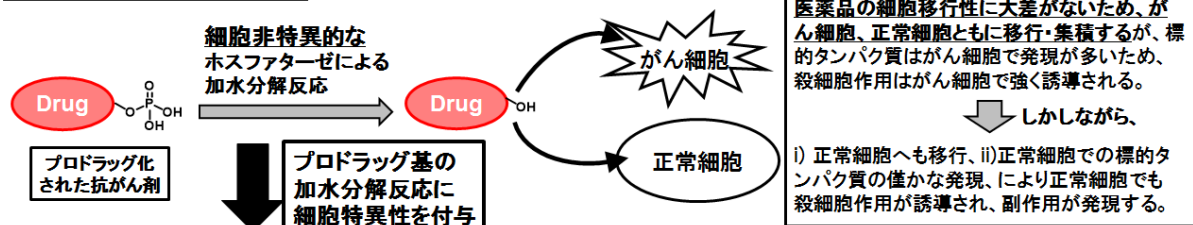
1. 研究開始当初の背景

医薬品開発において、医薬品の *in vitro* 活性を高めることが重要なのは当然だが、臨床応用を考える上で溶解性などの物理的性質を生体内に適用可能なレベルに引き上げることはより重要である。物理的性質の改善、体内動態の調節を行うために医薬品はしばしば「プロドラッグ化」される。例えば、溶解性の悪い化合物はリン酸化することにより溶解性が改善し、生体に適用可能となる場合がある。しかし、これまでに知られている多くのプロドラッグ基は細胞内外に普遍的に存在するエステラーゼやホスファターゼなどを標的としてきたため、特定の細胞でのみ活性本体の化合物が放出される例はそれほど多くはなかった。

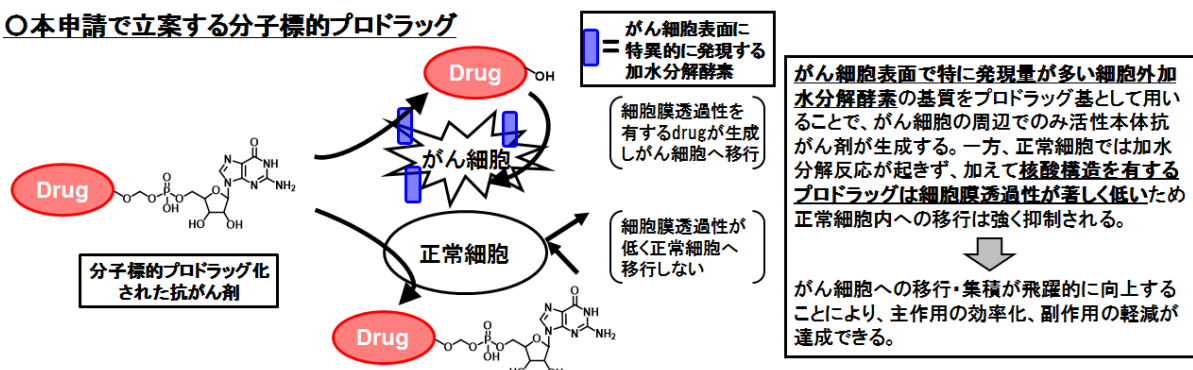
一方、ここ20年ほどの創薬研究においては「分子標的薬」として特定のがん細胞でのみ発現するタンパク質を特異的に阻害することで周囲の正常細胞には悪影響を与えず、がん細胞のみに殺細胞作用を発現する小分子の開発が行われてきた。理想的には副作用の全くない抗がん剤が期待されるが、現実的には副作用の発現が見られる。この原因は、分子標的薬に根本的な off-target 作用があること、がん細胞に対して標的とするタンパク質が正常細胞でも僅かに発現していること、分子標的薬は正常細胞、がん細胞両者へ大差ない細胞膜透過能を持つこと、に由来すると考えられる。

この背景を基に、申請者は分子標的薬のプロドラッグ基に特異的な細胞移行性能を付与し効率的な集積を促進できれば、既存の分子標的薬の主作用を増強し、かつ副作用を軽減できるのではないかと考えた(下図)。特に、細胞外の酵素を標的とすることにより、がん細胞特異的な酵素反応前後で細胞膜透過性を大きく変化させ、がん細胞周辺で生成する活性本体の分子標的薬をがん細胞へ特異的に移行・集積させられると考えた。細胞外の酵素を標的とすることは、一般的にターゲティングが容易である点、細胞膜透過性を考慮することなく分子設計が可能であり、高度に水溶性化させることによりそれ自身の拡散による細胞内への移行を極めて抑制させられる点で細胞内酵素より優位性が高い。

○従来の分子標的薬の作用



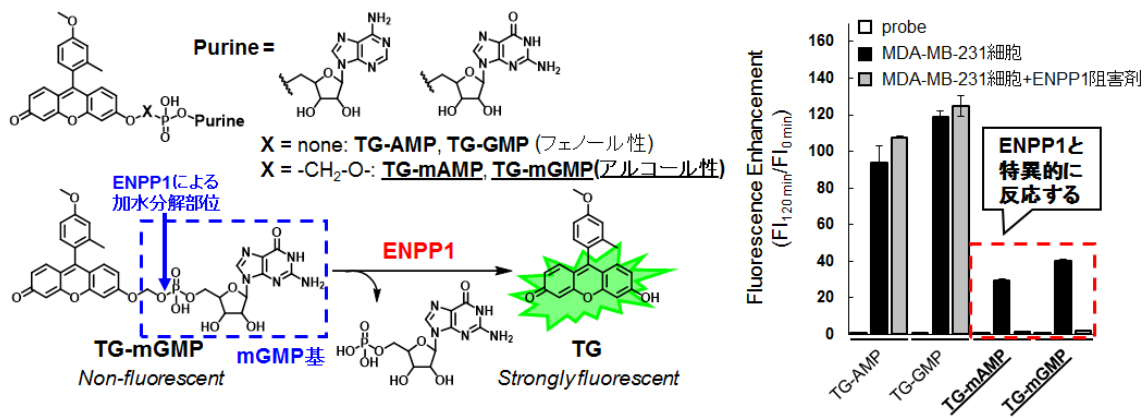
○本申請で立案する分子標的プロドラッグ



2. 研究の目的

がん細胞の細胞外に特異的に発現する加水分解酵素はγ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)を始め幾つか知られているが、申請者はENPP1 (ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1) に着目した。ENPP1は細胞外に触媒ドメインを持つ膜タンパク質であり、ATPを基質としてホスホジエステラーゼ活性を示すことが知られている。興味深いことに、ENPP1は悪性度の高い脳腫瘍や乳がんが発現量が著しく高いことが示され (*PLoS One* 8, e66752 (2013), *Nat. Commun.* 6, 7318 (2015))、がん幹細胞性の獲得・維持に必要であることが報告されている (*Cell Death Differ.* 21, 929-940 (2014))。即ち、ENPP1を標的とすることは「がん幹細胞を標的」とすることとなり、神経膠芽腫やトリプルネガティブ乳がんなど悪性度が高く、有効な治療法の乏しいがんに対して効果的な治療法を提案できる。

【 1 研究目的、研究方法など(つづき)】



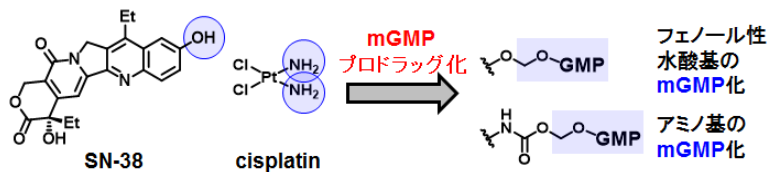
申請者は ENPP1 活性検出蛍光プローブの開発を行う過程で、ENPP1 の基質特異性に関する重要な知見を得た (上図)。ATP が生体内基質である一方で、GMP がより良い基質になる点 (TG-mAMP vs. TG-mGMP)、加水分解を受けるリン酸基をフェノール性エステルではなくアルコール性エステルにすることで、他の酵素による加水分解が完全に抑制され ENPP1 に特異的な基質になる点を見出した (TG-GMP vs. TG-mGMP)。実際、TG-mGMP を ENPP1 が過剰発現する乳がん細胞株 MDA-MB-231 に処理すると ENPP1 活性を蛍光検出可能であり、一方で申請者が開発した ENPP1 阻害剤処理でその蛍光は完全に抑制された (上図)。即ち、メチレンオキシ GMP(mGMP) 基は様々なホスファターゼ、ホスホジエステラーゼなどが複雑に存在する環境において ENPP1 と特異的に反応することが明らかになった (未発表)。

以上の知見を基に、本研究では『がん幹細胞で高発現する ENPP1 の特異的基質である mGMP 基を「分子標的プロドラッグ基」として用いることが、抗がん剤による主作用の増強、副作用の軽減を達成するための戦略として極めて有効であることを示す』ことを目的とする。

3. 研究の方法

本申請研究では、「細胞内で作用する既存の抗がん剤の更なる高機能化」を目指し、mGMP 基の分子標的プロドラッグ基としての潜在性を評価し、主作用の増強、副作用の軽減が真に達成されるか検討するために以下の実験 1) - 5) を順に行う。

1) 汎用される抗がん剤 (SN-38, cisplatin) を用いて mGMP 基によるプロドラッグ化を行う。各々の抗がん剤のフェノール性水酸基、アミノ基はそれぞれ図 3 に示すようにプロドラッグ化し、『分子標的プロドラッグ化抗がん剤』の合成を達成する。



2) 後述する実験に用いる 5 種類の細胞株において、活性本体化合物である SN-38, cisplatin の増殖阻害活性 (GI₅₀ 値) を評価し、各細胞間でその活性に大差がないことを確認する。

3) ENPP1 を過剰発現する乳がん細胞株 MDA-MB-231、脳腫瘍細胞株 C6 を用いて開発した分子標的プロドラッグ化抗がん剤が細胞増殖を阻害できるか検討する。またコントロール実験として、前述 2 種の細胞に ENPP1 阻害剤を前処理することにより増殖阻害活性が消失するか評価する。さらに、ENPP1 の発現が低い乳がん細胞株 HCC1954、脳腫瘍細胞株 SK-N-SH および非腫瘍由来細胞 HEK293 を用いて分子標的プロドラッグ化抗がん剤の効果が見られないことも確認し、ENPP1 活性依存的な増殖阻害活性であることを確かめる。

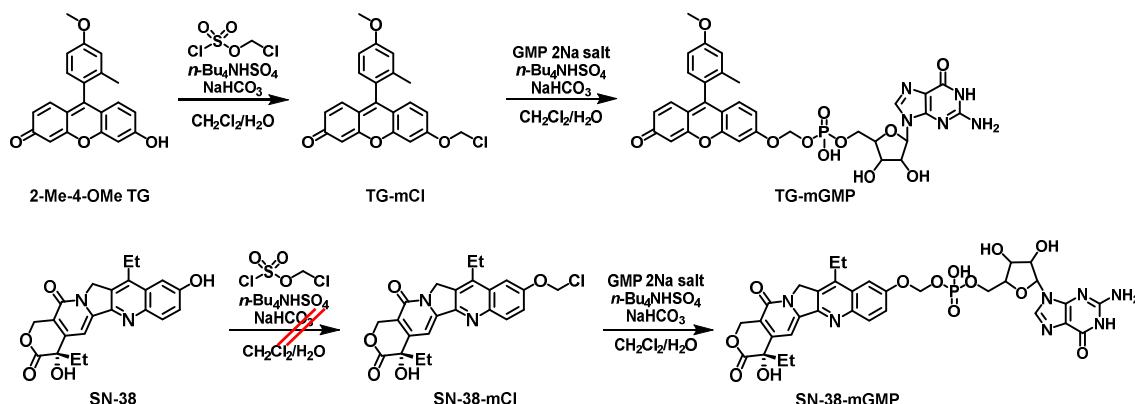
4) ENPP1 過剰発現細胞 (MDA-MB-231 など) および低発現細胞 (HCC1954 など) を共培養する系において、分子標的プロドラッグ化抗がん剤が選択的に ENPP1 過剰発現細胞に作用し増殖阻害を誘導可能か検討する。(即ち、副作用の軽減を確認する実験を実施する。)

5) ENPP1 過剰発現、低発現がん細胞をそれぞれ同一個体に移植したがんモデルマウスにて、分子標的プロドラッグ化抗がん剤が選択的に ENPP1 過剰発現がん細胞に作用し、腫瘍縮小作用を示すか検討し、ENPP1 を標的とした分子標的プロドラッグ技術の意義を明白にする。

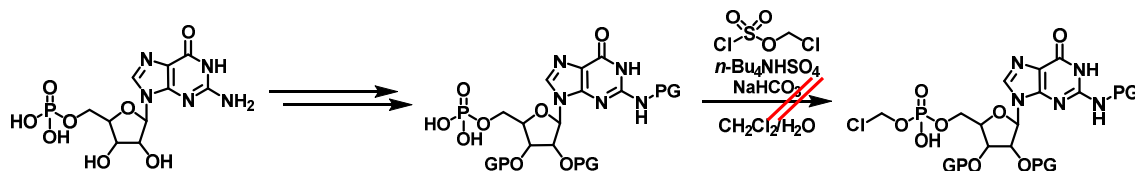
【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

4. 研究成果

本研究では、3-1) で述べた SN-38 などを mGMP 化する反応開発に非常に苦労した。即ち、TokyoGreen (TG) を用いた場合には速やかかつ安定に得られる TG-mCl を得ることができるが、同じ反応条件を他のフェノール性水酸基に適用した場合には生成物の SN-38-mCl が不安定であり得ることができなかった。

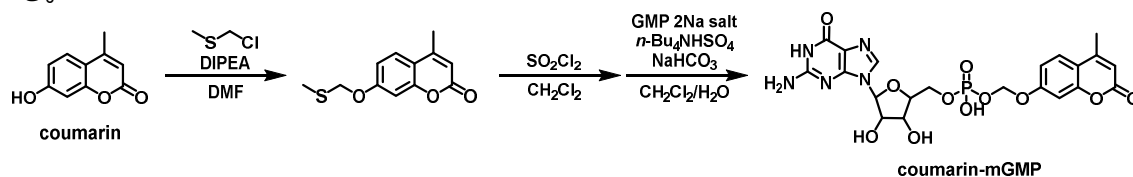


また、GMP 基側に保護基をかけるなど構造変換した後、mCl 化することで様々なフェノール性基質に普遍的に適用可能な反応剤を得ようとも試みたが、やはり mCl 基の高い反応性が故に目的とする化合物を得ることができなかった。



蛍光色素である TG においてのみ安定な生成物が得られることは非常に不自然だと考えられたためクマリン色素を用いて同様の反応条件で mCl 化ができるか検討したもののやはり生成物は不安定であった。

そこで、mCl 体を単離せずに次の GMP 化反応に進めるような条件を探ることとした。その結果、coumarin-mGMP をまずまずの収率で得ることができた。今後、この最適化された条件を利用して SN-38 を初めとする抗がん剤を mGMP 化しプロドラッグ構造としての有用性を証明する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sawada M, Ohno N, Kawaguchi M, Huang SH, Hikita T, Sakurai Y, Bang Nguyen H, Quynh Thai T, Ishido Y, Yoshida Y, Nakagawa H, Uemura A, Sawamoto K	4. 巻 37
2. 論文標題 PlexinD1 signaling controls morphological changes and migration termination in newborn neurons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 e97404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.201797404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kunieda K, Yamauchi H, Kawaguchi M, Ieda N, Nakagawa H	4. 巻 28
2. 論文標題 Development of a fluorescent probe for detection of citrulline based on photo-induced electron transfer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 969-973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2018.01.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi M, Tani T, Hombu R, Ieda N, Nakagawa H	4. 巻 54
2. 論文標題 Development and cellular application of visible-light-controllable HNO releasers based on caged Piloty's acid.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem Commun	6. 最初と最後の頁 10371-10374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8cc04954h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi M, Taniguchi A.	4. 巻 139
2. 論文標題 [Life-oriented Chemistry in Pharmaceutical Sciences].	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 261-262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.18-00174-F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ieda N, Oka Y, Yoshihara T, Tobita S, Sasamori T, Kawaguchi M, Nakagawa H	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure-efficiency relationship of photoinduced electron transfer-triggered nitric oxide releasers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38252-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kunieda Kazuki, Kawaguchi Mitsuyasu, Ieda Naoya, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of a highly sensitive fluorescence probe for peptidyl arginine deiminase (PAD) activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 923 ~ 928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.01.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Mitsuyasu, Ieda Naoya, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 62
2. 論文標題 Development of Peptide-Based Sirtuin Defatty-Acylase Inhibitors Identified by the Fluorescence Probe, SFP3, That Can Efficiently Measure Defatty-Acylase Activity of Sirtuin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 5434 ~ 5452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b00315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ieda Naoya, Hotta Yuji, Kawaguchi Mitsuyasu, Kimura Kazunori, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 67
2. 論文標題 In Cellulo and ex Vivo Availability of a Yellowish-Green-Light-Controllable NO Releaser	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 576 ~ 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Mitsuyasu, Han Xiang, Hisada Tomoka, Nishikawa Sayaka, Kano Kuniyuki, Ieda Naoya, Aoki Junken, Toyama Tatsuya, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 62
2. 論文標題 Development of an ENPP1 Fluorescence Probe for Inhibitor Screening, Cellular Imaging, and Prognostic Assessment of Malignant Breast Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 9254 ~ 9269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b01213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Yuhei, Wakita Hiroo, Kawaguchi Mitsuyasu, Ieda Naoya, Osada Shigehiro, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Ratiometric assay of CARM1 activity using a FRET-based fluorescent probe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126728 ~ 126728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.126728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagano Norimichi, Honjo Megumi, Kawaguchi Mitsuyasu, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu, Kano Kuniyuki, Aoki Junken, Komatsu Toru, Okabe Takayoshi, Kojima Hirotatsu, Nagano Tetsuo, Aihara Makoto	4. 巻 42
2. 論文標題 Development of a Novel Intraocular-Pressure-Lowering Therapy Targeting ATX	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1926 ~ 1935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Mitsuyasu, Okabe Takayoshi, Okudaira Shinichi, Hama Kotaro, Kano Kuniyuki, Nishimasu Hiroshi, Nakagawa Hidehiko, Ishitani Ryuichiro, Kojima Hirotatsu, Nureki Osamu, Aoki Junken, Nagano Tetsuo	4. 巻 63
2. 論文標題 Identification of Potent In Vivo Autotaxin Inhibitors that Bind to Both Hydrophobic Pockets and Channels in the Catalytic Domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3188 ~ 3204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b01967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Shingo, Komatsu Toru, Watanabe Rikiya, Zhang Yi, Inoue Taiki, Kawaguchi Mitsuyasu, Nakagawa Hidehiko, Ueno Takaaki, Okusaka Takuji, Honda Kazufumi, Noji Hiroyuki, Urano Yasuteru	4. 巻 6
2. 論文標題 Multiplexed single-molecule enzyme activity analysis for counting disease-related proteins in biological samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaay0888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aay0888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川口充康、山田輝、家田直弥、中川秀彦
2. 発表標題 caspase-1活性を指標とした単一細胞パイロトーシス可視化プローブの開発
3. 学会等名 平成30年度生理学研究所研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 川口充康、若森久幸、家田直弥、中川秀彦
2. 発表標題 Dinitrobenzene骨格を有するCys-SSH検出蛍光プローブの開発と細胞での機能評価
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会学術集会・第18回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 川口充康、若森久幸、家田直弥、中川秀彦
2. 発表標題 Dinitrobenzene骨格を基盤としたCys-SSH蛍光プローブ類の開発と生細胞での機能評価
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 川口充康、家田直弥、中川秀彦
2. 発表標題 SIRT2脱アシル化活性阻害剤の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 川口充康、中川秀彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 Precision Medicine	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 化合物、光応答性放出制御剤	発明者 家田直弥、中川秀彦、川口充康	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-038944	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ナノ粒子、水性分散液、一酸化窒素放出制御剤	発明者 家田直弥、中川秀彦、川口充康	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-051163	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 マイクロデバイスを用いたENPP活性検出法の開発	発明者 浦野泰照、小松徹、坂本眞伍、野地博行、中川秀彦、川口	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、62/858,388	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 化合物、光応答性酸素消費剤	発明者 家田直弥、中川秀彦、川口充康	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-130019	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----