

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16719

研究課題名(和文) がん微小環境におけるピリミジン生合成経路の生理的な役割

研究課題名(英文) De novo biosynthesis of pyrimidine in tumor microenvironment.

研究代表者

佐倉 孝哉 (SAKURA, Takaya)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：60816726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ピリミジン生合成経路の律速酵素であるヒトジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHODH)は抗がん剤の標的酵素の一つである。また低酸素条件となるがん微小環境においてはフマル酸呼吸がエネルギー代謝を担う事が知られているが、メタボローム解析によりヒトDHODHがフマル酸呼吸に寄与している可能性が示唆された。さらにヒトDHODHの阻害剤を用いた構造活性相関および複合体結晶構造解析に加えて、in vitro、in vivoで抗がん活性の評価も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素条件下におけるエネルギー代謝に重要なフマル酸呼吸とヒトDHODHが共役する可能性を示す今回の結果は、がん微小環境で増殖するがん細胞の増殖機構の解明に重要な科学的知見であると言える。さらに複数のFL誘導体のヒトDHODH およびがん細胞に対する阻害活性、構造活性相関、複合体結晶構造解析の結果はヒトDHODHを標的とした抗がん剤の効率的な設計に有益な基盤情報となる。

研究成果の概要(英文)：Pyrimidine de novo biosynthesis is an important metabolic pathway for cancer cell proliferation under tumor microenvironment. Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), the rate-limiting enzyme, is one of the targets for the cancer drug development. Cancer cells utilize fumarate respiration for the energy metabolism instead of conventional oxygen respiration due to limited metabolic precursors and oxygen under tumor microenvironment. Metabolome analysis using inhibitors against enzymes of electron transport chain showed that human DHODH likely contributes to fumarate respiration under tumor microenvironment. We also analyze activities of ferulenol and its derivatives against human DHODH and cancer cells, structure-activity relationship (SAR), and several co-crystal structures. This fundamental information might contribute to anti-cancer drug development targeting human DHODH.

研究分野：寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：ピリミジン生合成 ジヒドロオロト酸脱水素酵素 フマル酸呼吸 がん微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

DNA や RNA といった核酸の構成成分であるピリミジンは生体内において生合成経路とサルベージ経路の二つの代謝経路によって合成されている。ピリミジン生合成経路の律速酵素であるジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHODH)は、活発な細胞増殖のためにピリミジンを多量に必要とするがん細胞の標的酵素となっているが、前駆体および酸素供給が不十分ながん微小環境におけるピリミジン生合成のメカニズムは不明な点が多い。通常、生物はミトコンドリアの複数の複合体を介した電子伝達系において、酸素を電子受容体として使って ATP を合成するが(呼吸鎖)がん細胞が生息するがん微小環境は低酸素であるため、がん細胞は酸素の代わりに複合体 II によるフマル酸を電子受容体として用いる「フマル酸呼吸」を行うことが知られている。ヒト DHODH と複合体 II はともにミトコンドリア内膜に存在し、エネルギー代謝において電子伝達を担う重要な酵素である。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん微小環境において亢進する特殊な代謝系であるフマル酸呼吸とピリミジン生合成経路の関係に注目し、その生理的な役割を明らかにする。また、がん細胞の生理という基礎医学的な研究目的に加えて、ヒト DHODH 阻害剤として開発を進めている Ascofuranone (AF) や Ferulenol (FL) の誘導体の構造活性相関や結晶構造解析も行い、がん微小環境で増殖するがん細胞特異的な誘導体設計を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 阻害剤および RNAi を用いたフマル酸呼吸依存的なピリミジン生合成経路の探索

“がん微小環境においてがん細胞はフマル酸呼吸依存的なピリミジン生合成を行う”という仮説の検証を行った。ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 を用いて RNAi によりヒト DHODH と複合体 II のノックダウンを行い、ウェスタンブロットングでタンパク質の発現量を評価した。また低酸素・低栄養条件下において、IC<sub>50</sub> の濃度の各種呼吸鎖酵素阻害剤 (Rotenone (複合体 I), Atpenin A5 (複合体 II), Ascochlorin (複合体 III), AF) で 48 時間処理した DLD-1 細胞から代謝物を抽出し、GC-MS (SHIMADZU 社製ガスクロマトグラフ-四重極型質量分析装置 QP2010 Ultra) によりメタボローム解析を実施した。

#### (2) FL 誘導体とヒト DHODH の構造活性相関および複合体結晶構造解析

ヒト DHODH 阻害作用を持つ FL に着目し、その誘導体の構造活性相関の解析を行った。さらに FL 誘導体とヒト DHODH の複合体構造解析を行った。

#### (3) 低酸素・低栄養条件下における DLD-1 に対する FL 誘導体の活性測定

FL 誘導体の低酸素・低栄養条件下における DLD-1 に対する IC<sub>50</sub> を調べ、その結果を基に阻害作用に重要な置換基を調べた。

#### (4) がんマウスモデルを用いたヒト DHODH 阻害剤の効果

低酸素・低栄養条件下の DLD-1 に対して FL よりも高活性の FL 誘導体は見つからなかったため、AF を用いて免疫不全マウスに DLD-1 を移植した Xenograft モデルによるヒト DHODH 阻害の抗がん活性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 阻害剤および RNAi を用いたフマル酸呼吸依存的なピリミジン生合成経路の探索

ウェスタンブロットングによる評価ではタンパク質の発現量の顕著な低下が観察できたが、低酸素・低栄養条件下の DLD-1 の細胞増殖や阻害剤に対する感受性への影響はほとんど観察できなかった。ヒト細胞においてピリミジン合成は生合成経路とサルベージ経路の二つがあり、通常培養条件下ではヒト DHODH は必須ではないことから、より詳細な解析には CRISPR 等を用いたノックアウト株が必要であると考えられる。各種呼吸鎖阻害剤によるメタボローム解析ではフマル酸呼吸において複合体 II の逆反応により生成するコハク酸の定量を試みたが、グリシンのピークとの分離が困難であり、コハク酸の定量は断念した。次に電子受容体となるフマル酸の変動を調べた。AF 処理群においてフマル酸の蓄積が確認され、低酸素・低栄養条件下において、ヒト DHODH から複合体 II への電子の流れがフマル酸呼吸に寄与している可能性を示唆している。DHODH は三大感染症の一つであるマラリアを引き起こすマラリア原虫の創薬標的でもあり、マラリア創薬において DHODH 阻害剤の標的バリデーショナルの方法として、ユビキノン非依存的に細胞質でオロト酸を生成できる酵母 DHODH(yDHODH)発現原虫株を用いる方法

が確立されている。yDHODH 発現細胞はピリミジン合成経路が細胞質でバイパスされ DHODH 阻害剤に対して耐性になることから、ヒト DHODH 阻害剤のバリデーションにも活用できると考え、哺乳類細胞での発現系構築を行った。発現プラスミドをマラリア原虫発現用ベクターから哺乳類細胞発現用ベクターへと再構築し、遺伝子導入により yDHODH の哺乳類細胞発現系を構築する事に成功した(図1)。現在、安定的に yDHODH を発現する細胞株を樹立すべく、最適化を行っている。この評価系は今後、がん細胞のヒト DHODH を標的とする創薬において非常に有効なツールとなる。

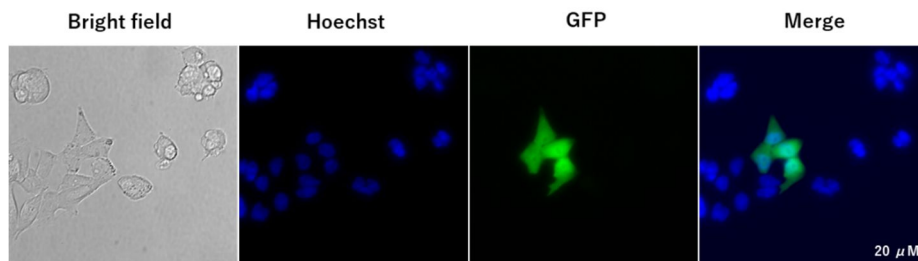


図 1. yDHODH-GFP を発現する DLD-1

### (2) FL 誘導体とヒト DHODH の構造活性相関および複合体結晶構造解析

ヒト DHODH と 24 種類の FL 誘導体を用いた構造活性相関により 5 つの FL 誘導体が FL と同程度の IC<sub>50</sub> (152 - 531 nM) を示した。さらに誘導体の複合体結晶構造解析を行い、16 種類の FL 誘導体とヒト DHODH の複合体結晶構造を得た。いくつかの誘導体では母核であるクマリン環の向きが FL と異なり、さらに側鎖の結合様式も異なる事が明らかとなった(図2)。AF の場合、母核の結合部位においてヒト DHODH のアミノ酸側鎖と多数の水素結合を形成し、特定の結合様式を取る事が分かっている。FL のヒト DHODH に対する IC<sub>50</sub> (138 nM) は AF (38 nM) の 4 倍程度高いが、これら結合様式の差異が二つの阻害剤の IC<sub>50</sub> の差を生み出している可能性が示唆された。一方で今回の結果から FL の側鎖の構造を変化させることにより、より活性の高い誘導体を設計できる可能性が示唆された。これらの結果はヒト DHODH 阻害剤の効率的な設計に非常に有益な情報となり、現在論文投稿用にデータ解析を進めている。

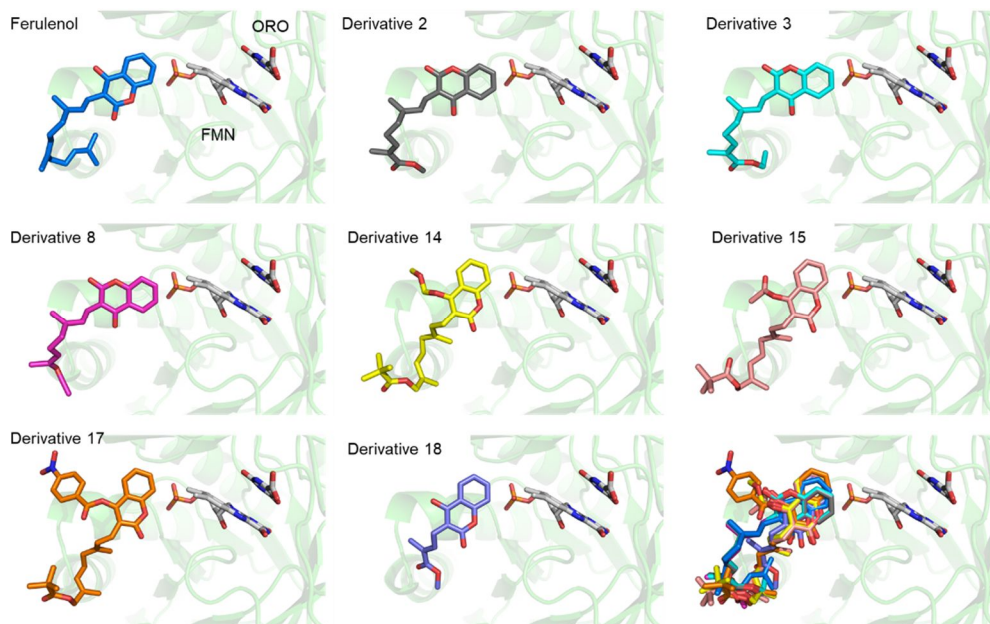


図 2. FL および誘導体とヒト DHODH の結合様式

(ORO:オロト酸, FMN:フラビンモノヌクレオチド)

### (3) 低酸素・低栄養条件下における DLD-1 に対する FL 誘導体の活性測定

24 種類の FL 誘導体を用いて低酸素・低栄養条件下における DLD-1 の増殖阻害活性を評価したが、FL よりも高活性の誘導体は見つからなかった。

#### (4) がんマウスモデルを用いたヒト DHODH 阻害剤の効果

低酸素・低栄養条件下の DLD-1 に対して FL よりも高活性の FL 誘導体は見つからなかったため、AF を用いて免疫不全マウスに DLD-1 を移植した Xenograft モデルによるヒト DHODH 阻害の抗がん活性を評価した。その結果、AF (300 mg/kg) がコントロールとして用いた大腸がんの標準治療薬であるイリノテカン (40 mg/kg) と同等の抗がん活性を示した (図 3)。この事はヒト DHODH ががん微小環境で増殖するがん細胞の創薬標的として有望である事を示しており、今後、抗がん活性のメカニズム解析や阻害剤の最適化により新しいヒト DHODH 阻害剤の開発に繋がる事が期待できる (Tagod et al. 学会発表, 2020)。

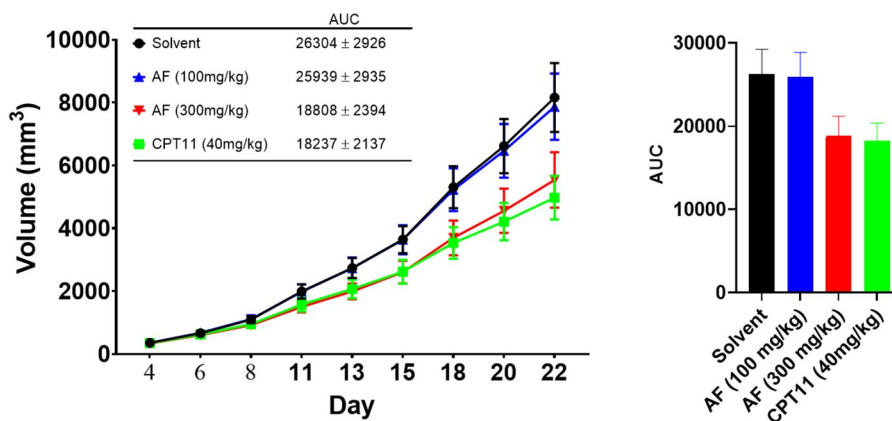


図 3. Xenograft モデルによる AF の抗がん活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Dan, Hartuti Endah Dwi, Inaoka Daniel Ken, Sakura Takaya, Amalia Eri, Nagahama Madoka, Yoshioka Yukina, Tsuji Naotoshi, Nozaki Tomoyoshi, Kita Kiyoshi, Harada Shigeharu, Matsubayashi Makoto, Shiba Tomoo	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural and Biochemical Features of Eimeria tenella Dihydroorotate Dehydrogenase, a Potential Drug Target	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1468 ~ 1468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11121468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hartuti Endah D, Sakura Takaya, Wang Xinying, Mochizuki Kota, Acharjee Rajib, Matsuo Yuichi, Mori Mihoko, Shiomi Kazuro, Nozaki Tomoyoshi, Hamano Shinjiro, Kita Kiyoshi, Inaoka Daniel Ken
2. 発表標題 Identification of new antimalarial drug candidate that inhibit Plasmodium falciparum mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mohammed S. O. Tagod, Takaya Sakura, Yukiko Miyazaki, Daniel Ken Inaoka, Kiyoshi Kita
2. 発表標題 Ascofuranone suppresses cancer cells growth under microenvironment conditions through blockage of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第46回討論会
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
研究協力者	北 潔  (KITA Kiyoshi)		
研究協力者	志波 智生  (SHIBA Tomoo)		
研究協力者	齋本 博之  (SAIMOTO Hiroyuki)		
研究協力者	稲岡 健ダニエル  (INAOKA Ken Daniel)		
研究協力者	アマリア エリ  (AMALIA Eri)		
研究協力者	モハメド タゴッド  (MOHAMMED S. O. Tagod)		
研究協力者	宮崎 幸子  (MIYAZAKI Yukiko)		

## 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
---------	---------