

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350981

研究課題名(和文) De novoピリミジン生合成経路を標的とした新規抗癌剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-cancer agents targeting de novo pyrimidine biosynthetic pathway

研究代表者

川谷 誠 (Kawatani, Makoto)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：50391925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、de novoピリミジン生合成経路を強力に阻害するDI-01をリードとして新規抗がん剤リードを開発することである。DI-01は由来の異なるさまざまながん細胞の増殖をnMオーダーで強く阻害し、また、既存の抗がん剤5-フルオロウラシル(5-FU)と併用することで著しい効果増強作用を示した。DI-01は溶解性が低くかつ代謝的に不安定であったが、一連の構造最適化により、薬物動態が大幅に改善されたDI-148の創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop novel anti-cancer agents targeting de novo pyrimidine biosynthetic pathway based on our recently-discovered DI-01 compound. DI-01 strongly inhibited cell proliferation in a wide variety of human cancer cell lines, and showed a marked synergistic effect when used with 5-fluorouracil (5-FU). Although DI-01 was poorly-soluble and metabolically unstable, we successfully developed DI-148 with a good pharmacokinetic profile by a series of structure optimization.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がん 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

(1) ピリミジン塩基を新規に合成する de novo ピリミジン生合成経路は、増殖が盛んながん細胞や活性化した T 細胞などの免疫担当細胞で亢進していることから、抗がん剤や自己免疫疾患治療薬の標的として有望であると考えられる。しかし、現在までに、de novo ピリミジン生合成経路を標的にした抗がん剤はほとんど開発されていないのが現状である。

(2) 我々はこれまで、理化学研究所天然化合物バンク (RIKEN Natural Products Depository, NPDepo) の化合物ライブラリーを用いて、新規抗がん剤シードの探索研究を行ってきた。およそ 3 万化合物のスクリーニングを実施してきた過程で、de novo ピリミジン生合成経路を阻害するクマリン誘導体の小分子化合物 DI-01 を見出した。DI-01 はヒト白血病細胞 (HL-60 細胞) やヒト肺がん細胞 (A549 細胞) の増殖を nM オーダーで強力に阻害することがわかった。

2. 研究の目的

(1) DI-01 は in vitro において強力ながん細胞増殖阻害活性を示したことから、抗がん剤としての高いポテンシャルを有する。そこで本研究は、DI-01 をシード化合物として de novo ピリミジン生合成経路を標的とした新規抗がん剤リードを開発することを目的とする。

(2) 具体的な検討項目は以下に示す通りである。

- ① DI-01 のがん細胞増殖阻害機構を明らかにする。
- ② 由来の異なるさまざまながん種を用いて、DI-01 の効果が強くみられる最適ながん種を選定する。
- ③ 経口投与可能な DI-01 のリード化合物を創出する。
- ⑤ 担癌モデルマウスを用いて、リード化合物の抗がん剤としての有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

由来の異なる種々のヒトがん細胞株 (A549 細胞、HeLa 細胞、HL-60 細胞、Jurkat 細胞、K562 細胞、U937 細胞、A431 細胞、MCF-7 細胞、MDA-MB231 細胞、MKN74 細胞、PC-3 細胞、DU-145 細胞、HT29 細胞、HT1080 細胞、HepG2 細胞、WM266-4 細胞、SK-MEL-28 細胞、Saos-2 細胞、MG-63 細胞) は、DMEM あるいは RPMI1640 に fetal-calf serum を 10%、penicillin/streptomycin 溶液を 0.5% 添加した培地中、37°C、5% CO₂ の湿気中培養下で維持した。

(2) がん細胞増殖阻害活性評価

化合物のがん細胞に対する増殖阻害活性

は WST-8 法を用いて評価した。細胞を 96 穴プレートに播種し、翌日化合物を添加した。化合物添加から 72 時間後に、WST-8 試薬を各ウェルに添加し、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 (450 nm) を測定し、測定値から細胞生存率を求めた。

(3) 細胞周期解析

化合物を処理した細胞を PBS で洗浄後、PI 溶液 (0.005% propidium iodide、0.1% sodium citrate、0.2% NP-40) を加え、30 分氷上で遮光して静置することで DNA を染色した。その後、フローサイトメーターを用いて細胞周期を測定した。

(4) タンパク質の発現量解析

化合物を処理した細胞を RIPA バッファーで可溶化後、各サンプルのタンパク質濃度をそろえた。その後、SDS サンプルバッファーを加え、100°C で 5 分間加熱することで細胞抽出液を調製した。サンプルを SDS-PAGE で分離後、ウエスタンブロット法でタンパク質の発現量を解析した。

(5) 化合物の溶解性試験

化合物の溶解度は、溶液沈殿法を用いて測定した。DMSO に溶かした化合物を PBS あるいは蒸留水に加え、溶解した化合物の濃度を吸光度で定量化した。

(6) 化合物の代謝安定性試験

化合物をヒト、マウスあるいはラット由来のミクロソーム画分と混合し、30 分後あるいは 1 時間後に残った化合物を LC-MS を用いて定量化した。

(7) 薬物動態解析

マウスあるいはラットに、化合物を静脈内、腹腔内あるいは経口投与し、経時的に血液や臓器を採取した。血液中あるいは臓器中の化合物量を LC-MS で測定し、各種薬物動態パラメータを算出した。

4. 研究成果

(1) DI-01 は、HeLa 細胞や HL-60 細胞に対して S 期停止を誘導し、より高濃度あるいはより長時間処理することでアポトーシスを誘導した。

(2) 由来の異なるさまざまなヒトがん細胞に対する DI-01 の効果を調べた結果、DI-01 はほとんどのがん種に対して nM オーダーで増殖を阻害した。一方、Saos-2 細胞や MG-63 細胞といった骨肉腫細胞には高濃度を処理してもほとんど効果を示さないことがわかった。

(3) 臨床で用いられているさまざまな既存抗がん剤と DI-01 を併用処理してがん細胞増殖阻害効果を調べた結果、DI-01 はいくつか

の抗がん剤と相乗効果を示し、特に代謝拮抗剤の5-フルオロウラシル (5-FU) と顕著な効果増強作用を示した。

(4) DI-01 の全合成を行い、3 工程で収率がおよそ 60%の合成ルートを確認した。

(5) マウスあるいはラットを用いて DI-01 の体内動態、特に吸収と分布について調べた結果、DI-01 は経口投与および腹腔内投与で吸収されたが、経口投与によるバイオアベイラビリティは非常に低かった。また、DI-01 は広い組織移行性を示し、特に肺組織への移行性が高かった。

(6) DI-01 の in vitro における溶解性および代謝安定性を調べたところ、DI-01 は溶解性が低くかつ代謝的に不安定であることがわかった。このことが低い経口バイオアベイラビリティの要因になっていることが示唆された。

(7) DI-01 の溶解性および代謝安定性の向上を目的に 100 化合物以上の DI-01 誘導体を合成した。構造活性相関解析を行った後、活性を保持していた誘導体について、溶解性試験および in vitro 代謝安定性試験を実施した。その結果、2 つの有望化合物 (DI-146 と DI-148) を見出した。

(8) DI-146 は、DI-01 と比べ代謝安定性は向上しなかったが、活性および溶解性が向上した。

(9) DI-148 は、DI-01 と比べ活性がやや落ちるものの、溶解性および代謝安定性が著しく向上した。DI-148 をラットに経口投与あるいは静脈内投与し、その後、DI-148 の血中濃度を経時的に測定して各種薬物動態パラメータを算出した。その結果、DI-148 は DI-01 と比べ、経口バイオアベイラビリティが大幅に向上した (F = 32%)。このように、DI-01 の一連の構造最適化により、薬物動態の改善が認められた DI-148 を創製することに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Katsuyama S., Sugino K., Sasazawa Y., Nakano Y., Aono H., Morishita K., Kawatani M., Umezawa K., Osada H., and Simizu S. Identification of a novel compound that inhibits osteoclastogenesis by suppressing nucleoside transporters. *FEBS Lett.* 590, 1152-1162 (2016) 査読有
DOI: 10.1002/1873-3468.12146.
- ② Lim C. L., Nogawa T., Okano A., Futamura Y., Kawatani M., Takahashi S., Ibrahim D., and Osada H. Unantimycin A, a new neoantimycin analogue isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.* In press 査読有
DOI: 10.1038/ja.2015.124.
- ③ Shinohara Y., Kawatani M., Futamura Y., Osada H., and Koyama Y. An overproduction of astellolides induced by genetic disruption of chromatin remodeling factors in *Aspergillus oryzae*. *J. Antibiot.* 69, 4-8 (2016) 査読有
DOI: 10.1038/ja.2015.73.
- ④ Mizuno M., Miyazawa K., Tabuchi M., Tanaka M., Yoshizako M., Minamoto C., Torii Y., Tamaoka Y., Kawatani M., Osada H., Maeda H., and Goto S. Reveromycin A administration prevents alveolar bone loss in osteoprotegerin knockout mice with periodontal disease. *Sci. Rep.* 5, 16510 (2015) 査読有
DOI: 10.1038/srep16510.
- ⑤ Tang R., Gao L., Kawatani M., Chen J., Cao X., Osada H., Xiang L., and Qi J. Neuritogenic activity of tetradecyl 2, 3-dihydroxybenzoate is mediated through IGF-1 receptor/PI3K/MAPK signaling pathways. *Mol. Pharmacol.* 88, 326-34 (2015) 査読有
DOI: 10.1124/mol.115.097758.
- ⑥ 川谷誠、長田裕之、ケミカルバイオロジーと新規分子標的薬、日本臨牀、73、1273-1280 (2015) 査読無
- ⑦ 井本正哉、川谷誠、分子標的薬の実例、CSJ カレントレビュー19、26-33 (2015) 査読無
- ⑧ Kawatani M., Fukushima Y., Kondoh Y., Honda K., Sekine T., Yamaguchi Y., Taniguchi N., and Osada H. Identification of matrix metalloproteinase inhibitors by chemical arrays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1597-1602 (2015) 査読有
DOI: 10.1080/09168451.2015.1045829.
- ⑨ Minegishi H., Futamura Y., Fukushima S., Muroi M., Kawatani M., Osada H., and Nakamura H. Methyl 3-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino) benzoate (GN39482) as a tubulin polymerization inhibitor identified by MorphoBase and ChemProteoBase profiling methods. *J. Med. Chem.* 58, 4230-4241 (2015) 査読有
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00035.
- ⑩ Takahashi S., Nagano S., Nogawa T., Kanoh N., Uramoto M., Kawatani M., Shimizu T., Miyazawa T., Shiro Y., and Osada H. Structure-function analyses of cytochrome P450revI involved in reveromycin A biosynthesis and

- evaluation of the biological activity of its substrate, reveromycin T. *J. Biol. Chem.* 289, 32446-32458 (2014) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.598391.
- ⑫ Nakayama T., Thirukonda G. J., Nagasawa S., Kawahara I., Udagawa N., Yagami K., Kawatani M., Osada H., Doi Y., Yoshinari N., and Takahashi N. Polarization of osteoclasts on dental implant materials is similar to that observed on bone. *J. Oral Biosci.* 56, 136-142 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.job.2014.06.005
- ⑬ Kawamura T., Kondoh Y., Muroi M., Kawatani M., and Osada H. A small molecule that induces reactive oxygen species via cellular glutathione depletion. *Biochem. J.* 463, 53-63 (2014) 査読有
DOI: 10.1042/BJ20140669.
- ⑭ Kawatani M., and Osada H. Affinity-based target identification for bioactive small molecules. *MedChemComm* 5, 277-287 (2014) 査読有
DOI: 10.1039/C3MD00276D
- ⑮ Futamura Y., Kawatani M., Muroi M., Aono H., Nogawa T., and Osada H. Molecular target identification of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems. *ChemBioChem* 14, 2456-2463 (2013) 査読有
DOI: 10.1002/cbic.201300499.
- ⑯ Yabumoto T., Miyazawa K., Tabuchi M., Shoji S., Tanaka M., Kadota M., Yoshizako M., Kawatani M., Osada H., Maeda H., and Goto S. Stabilization of tooth movement by administration of reveromycin A to osteoprotegerin-deficient knockout mice. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 144, 368-380 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.ajodo.2013.04.016.
- ⑰ Nogawa T., Kawatani M., Uramoto M., Okano A., Aono H., Futamura Y., Koshino H., Takahashi S., and Osada H. Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus. *J. Antibiot.* 66, 621-623 (2013) 査読有
DOI: 10.1038/ja.2013.55.
- ⑱ Ueki M., Koshiro N., Aono H., Kawatani M., Uramoto M., Kawasaki H., and Osada H. Isolation of new polyketide metabolites, linearolides A and B, from a *Streptomyces* sp. RK95-74. *J. Antibiot.* 66, 333-337 (2013) 査読有
DOI: 10.1038/ja.2013.19.
- ⑲ Kanoh N., Suzuki T., Kawatani M., Katou Y., Oshima Y., Osada H., and Iwabuchi Y. Dual structure-activity relationship of osteoclastogenesis inhibitor methyl gerfelin based on TEG scanning. *Bioconjug. Chem.* 24, 44-52 (2013) 査読有
DOI: 10.1021/bc3003666.
- ⑳ Nogawa T., Takahashi S., Sekiyama Y., Takagi H., Uramoto M., Koshino H., Kawatani M., Shimizu T., and Osada H. Creation of novel reveromycin derivatives by alcohol added fermentation. *J. Antibiot.* 66, 247-250 (2013) 査読有
DOI: 10.1038/ja.2012.115.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Makoto Kawatani, Yasumitsu Kondoh, Kaori Honda, Tomomi Sekine, and Hiroyuki Osada. Chemical array screen identifies a novel MMP inhibitor NPK-18 that suppresses tumor cell migration. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2015/11/5-9, Hynes Convention Center, Boston, USA
- ② 青野晴美、川谷誠、二村友史、室井誠、峯岸秀充、中村浩之、長田裕之、MorphoBase および ChemProteoBase を用いた GN39482 の標的的同定、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015/6/10-12、松山全日空ホテル、松山市、愛媛県
- ③ Makoto Kawatani, Yasumitsu Kondoh, Kaori Honda, Tomomi Sekine, Yoshiki Yamaguchi, Naoyuki Taniguchi, and Hiroyuki Osada. Identification of matrix metalloproteinase inhibitors by chemical arrays. RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology 4th Annual Symposium, 2015/5/11-14, ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター、神戸市、兵庫県
- ④ 川谷誠、長田裕之、多面的アプローチによる生理活性化化合物の標的的同定、日本薬学会第 135 年会、2015/3/28、神戸学院大学、神戸市、兵庫県
- ⑤ 川谷誠、室井誠、二村友史、青野晴美、長田裕之、Target identification of collismycin A, a cytotoxic microbial product, by proteomic profiling、第 73 回日本癌学会学術総会、2014/9/25-27、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県
- ⑥ 川谷誠、室井誠、二村友史、青野晴美、長田裕之、ChemProteoBase を用いた collismycin A の作用標的的同定、第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2014/6/25-27、ホテルメトロポリタン仙台、仙台市、宮城県
- ⑦ 川谷誠、長田裕之、生理活性化化合物の標的的同定と創薬への試み、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御」第 5 回若手研究者ワークショップ、2014/5/29、名古屋大学、名古屋市、愛知

県

- ⑧ Makoto Kawatani, Gyo Inoue, Makoto Muroi, Yushi Futamura, Harumi Aono, and Hiroyuki Osada. Target identification of collismycin A, a cytotoxic microbial product, by proteomic profiling. RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology 3rd Annual Symposium, 2014/5/21-24, Ringberg Castle, Munich, Germany
- ⑨ 川谷誠、長田裕之、癌骨転移抑制剤のケミカルバイオロジー研究、第16回癌と骨病変研究会、2013/11/15、千代田放送会館、千代田区、東京都
- ⑩ Makoto Kawatani, Gyo Inoue, Makoto Muroi, Yushi Futamura, Harumi Aono, Masakazu Uramoto, Yayoi Hongo, Hiroyuki Koshino, Yasuhiro Igarashi, Naoko Takahashi-Ando, and Hiroyuki Osada. Identification of a target for collismycin A, a cytotoxic microbial product, by proteomic profiling. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2013/10/19-23, Hynes Convention Center, Boston, USA
- ⑪ 川谷誠、渡辺信元、谷口直之、長田裕之、Chemical array screening for matrix metalloproteinase-9 inhibitors、第72回日本癌学会学術総会、2013/10/3-5、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県
- ⑫ 川谷誠、青野晴美、二村友史、室井誠、渡辺信元、長田裕之、糸状菌由来新規抗がん活性物質 pyrrolizilactone の標的同定、第17回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013/6/12-14、国立京都国際会館、京都市、京都府
- ⑬ Makoto Kawatani, Harumi Aono, Toshihiko Nogawa, Yushi Futamura, Makoto Muroi, Nobumoto Watanabe, and Hiroyuki Osada. Target identification of pyrrolizilactone, a new cytotoxic fungal metabolite. RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology 2nd Annual Symposium, 2013/4/15-17, 理化学研究所、和光市、埼玉県

[その他]

ホームページ

<http://www.cbrg.riken.jp/csrs/ja/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川谷 誠 (KAWATANI, Makoto)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：50391925

(2) 研究協力者

奥村 英夫 (OKUMURA Hideo)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・タンパク質結晶解析推進室・研究員
研究者番号：90377903

清水 猛 (SHIMIZU Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・嘱託職員

平沼 佐代子 (HIRANUMA Sayoko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・嘱託職員

コンスタンティ ヴィエジバ (Konstanty WIERZBA)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・嘱託職員