

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870119

研究課題名(和文) 癌微小環境におけるピリミジンとエネルギー代謝の関係

研究課題名(英文) Pyrimidine biosynthesis and energy metabolism in cancer microenvironment

研究代表者

稲岡 健ダニエル (INAOKA, KEN DANIEL)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10623803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：正常細胞は血液によって供給される前駆体又は酸素に依存する。順に、サルベージ経路と生合成経路をピリミジン源として用いる。大腸癌や膵臓癌等の固形系癌内部では血管新生が不完全な環境(微小環境)であるにもかかわらず生存に必須なピリミジンを得ているが、その供給源は長年不明であった。本研究で、生化学・構造生物学・逆ケミカルバイオロジー手法を用いて癌微小環境では酸素呼吸からフマル酸呼吸へのスイッチングが行われ、このフマル酸呼吸はピリミジン生合成とNADHの再酸化を可能にしている事が明らかとなった。この事から、ピリミジン生合成経路の鍵酵素であるDHODHが新規薬剤標的として極めて有望である事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pyrimidine are building blocks of DNA/RNA and essential to sustain life. Human cells obtain pyrimidine bases from either salvage or de novo biosynthesis pathways, which are completely dependent on pyrimidine precursors and oxygen, respectively. Both nutrients are provided by blood and the molecular mechanism of both pathways are well studied. Solid tumors are known to be hypovascularized making the provision of those nutrients extremely low (tumor microenvironment). Since the growth is not affected, those type of cancer cells may obtain pyrimidines by unknown mechanism. The present study aimed to identify the mechanism of pyrimidine acquisition in tumor microenvironment by biochemical, structural biology and reverse chemical biology approaches. As the main result, we have identified a novel mechanism involving mitochondria, which allows the pyrimidines de novo biosynthesis even in the absence of oxygen and can be explored for development of new drugs for cancer chemotherapy.

研究分野：生化学

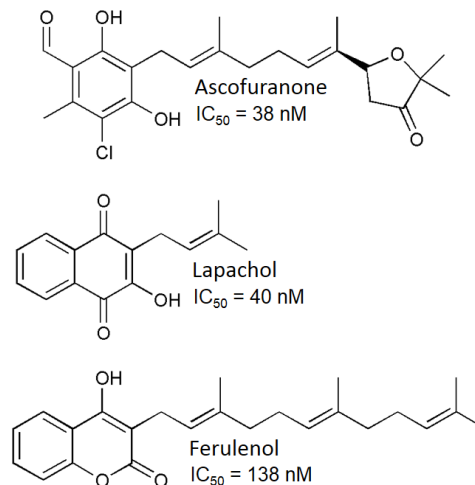
キーワード：癌微小環境 フマル酸呼吸 ピリミジン生合成経路 新規薬剤標的 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

ピリミジンは DNA や RNA を合成するための構成要素であり、全生物の生存に必要不可欠である。ヒトでは前駆体から合成されるサルベージ経路と細胞内で生合成される二種類の経路から全ピリミジン (UTP, CTP, TTP) の元となるウリジン酸(UMP)を得ている (図1)。サルベージ経路の場合、前駆体のウラシルやウリジンを元に細胞質で1~2ステップを経てUMPに変換される(図1)。また、ピリミジン生合成経路は合計6ステップで行われ、律速となる第4ステップ以外は細胞質で行われる (図1)。ピリミジン生合成経路の第4ステップ、ジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHODH)反応はミトコンドリアの内膜で行われ、ジヒドロオロト酸をオロト酸に酸化し、ユビキノンの電子を伝達する (図1)。DHODH に還元されたユビキノンの電子は呼吸鎖の複合体 III、チトクローム c、複合体 IV を経て最終的に酸素に伝達される。正常細胞では増殖に必要なピリミジンをサルベージ経路で確保できるため、生合成経路を阻害しても増殖に影響は無い。しかし、活性化した免疫細胞や増殖が異常に速い癌細胞などでは、増殖に必要なピリミジンがサルベージ経路のみでは確保できず、生合成経路が活性化される。そのため、ヒト DHODH 阻害剤は免疫抑制剤 (leflunomide、Sanofi-Aventis 社、抗リウマチ薬) として実用化され、その他の自己免疫疾患の治療薬として期待されている。また、肝癌や白血病等でも DHODH は薬剤標的となっている。ピリミジンを供給する両経路は、血液によって運ばれる前駆体と酸素を必要とするため、細胞内のピリミジン源は根本的に血液に依存している。しかし、大腸癌や膵臓癌等の血管

新生が未発達である固形系癌の内部組織は血液からのピリミジン前駆体・酸素の供給が乏しい過酷な環境に置かれているのにも関わらず増殖する。これら微小環境下 (低酸素・低栄養) にさらされている固形系癌におけるピリミジン供給源は長年の疑問であった (図2)。

図3: 申請者が見出した新規ヒトDHODH阻害剤



申請者らはこれまで、創薬を目指した DHODH 阻害剤の探索を行い、Ascofuranone (AF)、Lapachol (LC) と Ferulenol (FL) が極めて低濃度 (順に IC<sub>50</sub> が 38, 40 と 138 nM、図3) でヒト DHODH を阻害する事を見出した (特許出願番号 2012-122221)。この異なった骨格を持つ3種類の化合物は通常の培養条件下では大腸癌と膵臓癌由来の細胞に対し増殖阻害活性が低かったが、低酸素・低栄養条件下では、増殖阻害活性が70~170倍も増強する事を見出した。DHODH はピリミジン生合成経路の第4ステップを担う酵素であることから癌微小環境下でのピリミジン源は生合成経路に極めて依存していることが明らかとなった (論文投稿中)。さらに、微小環境下の様々な癌細胞では、ミトコンドリアの呼吸鎖が、複合体 I~IV で構成される酸素依存性の呼吸鎖から複合体 I と II のみで構成されるフマル酸依存的な呼吸鎖 (フマル酸呼吸) に移行変わる事を発見した (Tomitsuka et al., Ann N Y Acad Sci., 2010; Tomitsuka et al., J. Biochem., 2012; Sakai et al., Mitochondrion, 2013)。このフマル酸呼吸の最大の利点は酸素が無くても NADH の再酸化と膜電位の維持が可能になる事である。以上の結果から、微小環境下にある癌では DHODH を介してフマル酸呼吸と共役する新規合成経路によりピリミジンが供給されている可能性が示唆された。本研究は、癌微小環境におけるピリミジン源はフマル酸呼吸依存的な生合成経路で行われる直接的な証拠を得る事と、同時に新規薬剤標的として評価する事を目的とする。

図1: ヒト細胞におけるピリミジン取得経路

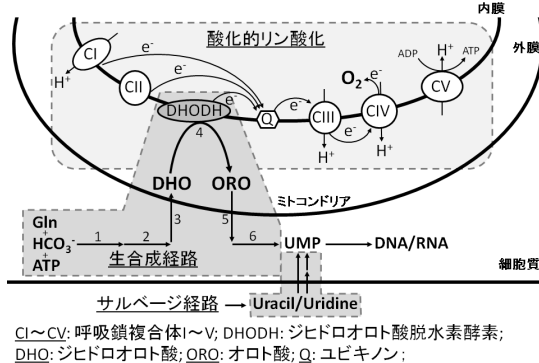
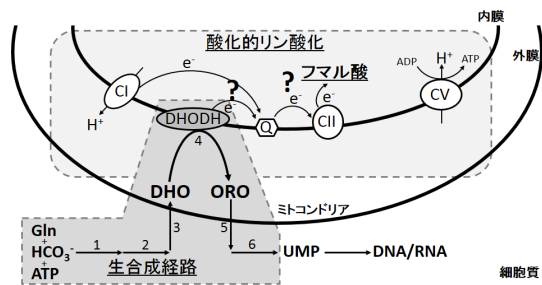


図2: 癌微小環境ではフマル酸呼吸が行われる



2. 研究の目的

本申請では、癌微小環境においてフマル酸呼吸依存的なピリミジン生合成が行われていることを証明する。さらに、新規薬剤標的としての可能性を逆ケミカルバイオロジー・構造生物学・分子生物学の手法を用いて検討する。研究期間内には以下の事を明らかにする。

1. フマル酸呼吸依存的なピリミジン生合成は、DHODH の電子がユビキノンを経由して複合体 II に受け渡される事によって行われると考えられる。そのため、微小環境において DHODH もしくは複合体 II を阻害するとピリミジン生合成が減少すると予想される。そこで、正常と微小環境条件下において DHODH または複合体 II の阻害剤を添加し細胞内のピリミジンを HPLC を用いて定量する。同様の実験を、DHODH と複合体 II の RNAi を用いたノックダウンの系で行う。以上の実験により、微小環境下においてピリミジン生合成とフマル酸呼吸の繋がりを明らかにする。

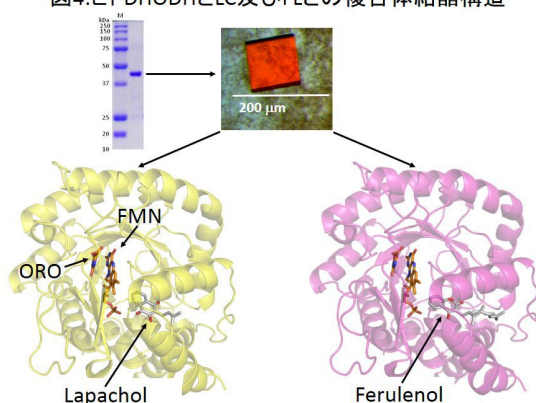
2. 当研究室ではすでに AF 及び FL をアフリカ睡眠病に対する薬剤として開発しており、約 200 種類の誘導体を有する。この誘導体を用いてヒト DHODH に対する構造活性相関を行う。これによって AF 及び FL のヒト DHODH 阻害活性に必須な置換基を同定すると同時に、より強力にヒト DHODH を阻害する誘導体を探索する。

3. AF、LC、FL、及び阻害活性が強い誘導体とヒト DHODH との複合体結晶構造解析を行う。これにより構造活性相関の結果を裏付けるとともに、異なった骨格を持つ 3 種類の化合物の阻害メカニズムを原子レベルで明らかにする。

4. 阻害活性が強い化合物を用いて、正常と微小環境条件下での細胞増殖阻害効果を検討し、微小環境特異的な効果を評価する。

5. 酵素と細胞を用いた阻害実験の結果を踏まえて化合物を一つに絞り、in vivo のモデル系を用いて抗癌作用を評価する。

図4:ヒトDHODHとLC及びFLとの複合体結晶構造



### 3. 研究の方法

#### 1. 阻害剤及び RNAi によるフマル酸呼吸依存的なピリミジン生合成経路の分子機構。

申請者はこれまで、微小環境において癌細胞のピリミジン源は、フマル酸呼吸依存的なピ

リミジン生合成経路によって供給されている手がかりを得ている。本申請ではこれを検証するために、逆ケミカルバイオロジー及び分子生物学の手法を用いる。微小環境において癌細胞のピリミジンの量はヒト DHODH 及び複合体 II の阻害剤または RNAi ノックダウンにより減少する事が予想できる。そのため、各酵素の阻害剤および RNAi と、正常及び微小環境の条件を組み合わせる癌細胞を培養し、各条件での核酸ヌクレオチドの量を HPLC で定量する。この実験では微小環境下で増殖する大腸癌由来の DLD-1 と膵臓癌由来の Caco-2 細胞を用いる。悪性リンパ腫も微小環境で増殖するため、免疫系の癌細胞を用いてヒト DHODH 阻害剤の効果も検討する。

#### 2. AF、LC、FL 誘導体の構造活性相関の解析及び絞り込み。

AF 及び FL はアフリカ睡眠病を引き起すトリパノソーマのシアン耐性末端酸化酵素を極めて低濃度で阻害し、高い抗寄生虫活性を示す。このことから、当研究室ではアフリカ睡眠病薬としての薬剤開発が行われており、合計約 200 種類の誘導体を有する。LC の誘導体に関しては、AF 及び FL 誘導体の情報を参考にして、連携研究者である齋本教授らが合成する予定である。これを用いて構造活性相関を行い、AF、LC 及び FL がヒト DHODH を阻害するために重要な構造を同定すると同時に、より強力にヒト DHODH を阻害する誘導体を探索する。具体的には、プレートリーダーを用いて AF、LC 及び FL 誘導体のヒト DHODH 阻害活性を評価する。この実験は各誘導体の終濃度を 0.2  $\mu\text{M}$  と 1  $\mu\text{M}$  存在下で行う。2 種類の濃度で行う事で、阻害の dose response を判断する。この実験で終濃度 0.2  $\mu\text{M}$  で 50% 以上ヒト DHODH を阻害する誘導体について再度  $\text{IC}_{50}$  を算出する。阻害活性が低下した化合物との情報を総合的に判断して構造活性相関の解析を行う。

#### 3. ヒト DHODH と AF、LC 及び FL 誘導体との複合体構造。

AF、LC 及び FL 誘導体の構造活性相関に基づいて、阻害活性が高い誘導体について積極的にヒト DHODH との複合体構造解析を行い、構造活性相関の結果を分子レベルで明らかにする。複合体結晶の作成には大量 (1 化合物あたり約 2 mg) の精製タンパク質が必要となるが、申請者はすでに大腸菌を用いた大量発現・大量精製の系を確立しており、10 L 分の大腸菌の培養から約 80 mg のヒト DHODH を精製できる。ヒト DHODH と阻害剤との共結晶化の系もすでに申請者のグループで確立しており、LC または FL との共結晶が得られ、1.8 Å 及び 1.9 Å 分解能で構造解析を進めている (図 4)。AF に関してはヒト DHODH との共結晶は出来ており、今年度中に京都工芸繊維大学の原田繁春教授の協力を得て、大型放射光施設で X 線回折データを測定する予定である。もう一つ重要な点は、この共結晶はすべて同じ結晶化条件で出来るため、各阻害剤との共結



晶化の条件検討が必要ないことである。そのため、共結晶化のハイスループット化が可能であり、ヒット化合物全ての複合体構造解析を確実に得ることができる。

#### 4. ヒト DHODH 阻害剤の、正常及び微小環境条件下での癌細胞増殖阻害効果。

前年度に得られたヒト DHODH 阻害剤の構造活性相関の情報に基づいて、正常及び微小環境条件下において癌細胞増殖阻害効果を検討する。この実験により、酵素レベルと細胞レベルでの構造活性相関の結果を比較し、微小環境でのピリミジン生合成経路を薬剤標的としたケミカルバリデーションを行う。

#### 5. 微小環境系の癌マウスモデルを用いたヒト DHODH 阻害剤の効果。

培養細胞を用いた結果を踏まえ、もっとも阻害効果を示した化合物と癌細胞を1個ずつ選択し、マウスモデルを用いて、移植した癌の増殖阻害効果を検証する。さらに、このモデルで移植した癌細胞から実際に化合物群とコントロール群においてピリミジンの量を定量し、癌の増殖とピリミジンの量に相関性があるか検討する。AF 及び FL の誘導体は全て連携協力者である鳥取大学の齋本博之教授によって全合成され、必要に応じて in vivo 実験に必要な約 200 ~ 500 mg 程度のスケールアップ合成が可能である。

#### 4. 研究成果

**阻害剤及び RNAi によるフマル酸呼吸依存的なピリミジン生合成経路の分子機構。** フマル酸呼吸の最終産物であるコハク酸の高感度な新規定量方法を開発し、各種呼吸鎖阻害剤存在下におけるコハク酸の産生量を測定した。正常培養条件下では複合体 II の阻害剤でコハク酸の量が上昇した。逆に、低酸素・低栄養条件下では複合体 II、複合体 I 及び DHODH 阻害剤によりコハク酸量が減少した。一方、複合体 III 阻害剤ではコハク酸の変動は見られなかった。これは正常培養では複合体 II がコハク酸脱水素酵素として機能し、低栄養・低酸素条件下ではフマル酸還元酵素として機能する事によって NADH の再酸化とピリミジン生合成を可能にすると言う事が判った。AF、LC、FL 誘導体の構造活性相関の解析及び絞り込み。当研究室が保有する AF 誘導体約 220 種類を用いてヒト DHODH に対し

スクリーニングを行い、IC50 が 10nM 以下で阻害する化合物を最終的に 3 種類見出した。

**ヒト DHODH と AF、LC 及び FL 誘導体との複合体構造。** で見出した新規ヒト DHODH 阻害剤の AF・LA 誘導体との複合体結晶構造を得た。**ヒト DHODH 阻害剤の、正常及び微小環境条件下での癌細胞増殖阻害効果。** で見出した強力な新規ヒト DHODH 阻害剤を最終的に 6 種類用いて低酸素・低栄養条件下における癌細胞の増殖を IC<sub>50</sub> が 1µM 以下で特異的に阻害する事が判った(図5)。**微小環境系の癌マウスモデルを用いたヒト DHODH 阻害剤の効果。** 27 年度で計画していた in vivo 実験を行うための AF、FL 及び LC 誘導体の絞り込みを行ったが、目的の合成量に達しなかったため、現在合成のスケールアップ中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1-Inaoka DK, Shiba T, Sato D, Balogun EO, Sasaki T, Nagahama M, Oda M, Matsuoka S, Ohmori J, Honma T, Inoue M, Kita K, Harada S. Structural Insights into the Molecular Design of Flutolanil Derivatives Targeted for Fumarate Respiration of Parasite Mitochondria. 2015 (査読有). Int J Mol Sci. 16, 15287-308.

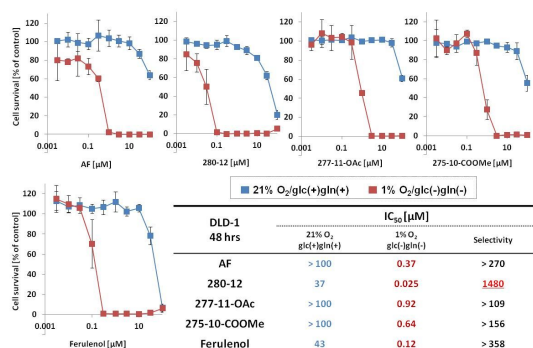
2-Yoshino R, Yasuo N, Inaoka DK (Equally contributed), Hagiwara Y, Ohno K, Orita M, Inoue M, Shiba T, Harada S, Honma T, Balogun EO, da Rocha JR, Montanari CA, Kita K, Sekijima M. Pharmacophore modeling for anti-Chagas drug design using the fragment molecular orbital method. 2015 (査読有). PLoS One. 10, e0125829

3-Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Kido Y, Tsuge C, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PAM, Kita K. and Harada S. Molecular basis for the reverse reaction of African human trypanosomes glycerol kinase. 2014 (査読有). Molecular Microbiol. 94, 1315-132

4-Young L, May B, Pendlebury-Watt A, Shearman J, Elliott C, Albury MS, Shiba T, Inaoka DK, Harada S, Kita K, Moore AL. Probing the ubiquinol-binding site of recombinant *Sauromatum guttatum* alternative oxidase expressed in *E. coli* membranes through site-directed mutagenesis. 2014 (査読有). Biochim Biophys Acta. 1837, 1219-25.

5-Balogun EO, Balogund JAB, Yusufe S, Inuwa HM, Ndamsf IS, Sheridang P, Inaoka

図5-ヒトDHODH阻害剤は低酸素・低栄養条件下で特異的に癌細胞の増殖を阻害する



DK, Shiba T, Harada S, Kita K, Esievh KAN and Nok AJ. Anemia amelioration by lactose infusion during trypanosomosis could be associated with erythrocytes membrane de-galactosylation. 2014 (査読有). Vet. Parasitol. 199, 259-263

〔学会発表〕(計 8件)

1-Daniel Ken Inaoka, Zannatul Ferdoush, Ohmori Junko, Fukuda Tomomi, Shinya Fukumoto, Shinichiro Fukumoto, Shiba Tomoo, Harada Shigeharu and Kiyoshi Kita. 線虫類のフマル酸呼吸と宿主内微小環境適応. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会. 2015/12/01-04, 神戸ポートアイランド.

2-原田繁春, 稲岡 ダニエル健, 北潔. 低酸素環境下で生息する回虫成虫複合体の構造・機能相関と特異的阻害剤の開発. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会. 2015/12/01-04, 神戸ポートアイランド.

3-遠海重裕, 稲岡 健ダニエル, 大森淳子, 坂本君年, 入江陸夫, 考口裕一, 八木欣平, 齋本博之, 北潔. 抗エキノコックス薬剤標的としてのミトコンドリアのフマル酸呼吸. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会. 2015/12/01-04, 神戸ポートアイランド.

4-米愛加, 長濱まどか, 梅本亮, 山本京史, 佐藤暖, 志波智生, 稲岡 ダニエル健, 福田智美, 織田雅次, 北潔, 原田繁春. 結晶構造から見たフルトラニルおよびその誘導体化合物の回虫成虫複合体に対する特異性. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会. 2015/12/1-4, 神戸ポートアイランド.

5-稲岡ダニエル健, Ferdoush Zannatul, 大森淳子, 福田智美, 福本晋也, 福本真一郎, 志波智生, 原田繁春, 北潔. 寄生線虫類のミトコンドリア酸呼吸と宿主内微小環境適応. 第23回分子寄生虫学ワークショップ / 第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 2015/8/30-9/2, 帯広畜産大学.

6- Daniel Ken Inaoka, Zannatul Ferdoush, Ohmori Junko, Fukumoto Shinya, Shinichiro Fukumoto and Kiyoshi Kita. 犬糸状虫の生活環におけるミトコンドリア呼吸鎖の変動 - 成虫とミクロフィラリアの比較 - 第9回蠕虫研究会. 2015/7/17-18, 岩手・つなぎ温泉清温荘.

7-稲岡ダニエル健, Emmanuel O. Balogun,

鈴木重雄、志波智生、原田繁春, Frederic Bringaud、北潔. 原虫ミトコンドリアの酢酸代謝. YoungMito 2015. 2015/7/9-10, 千葉・ホテルシーサイド宮奥ツカ.

8-Daniel Ken Inaoka, Yukiko Hirota, Takahiro Sasagawa, Eriko Tomitsuka, Chika Sakai, Hiroyuki Saimoto, Shigeharu Harada, Kiyoshi Kita. Pyrimidine de novo biosynthesis under tumor microenvironment. 第37回日本分子生物学会年会. 2014/11/25-27, パシフィコ横浜.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 1件)

名称: 駆虫剤  
発明者: 北 潔, 稲岡 健ダニエル, 山本 雅  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: W02015056768 A1  
出願年月日: 2014年10月17日  
取得年月日: 2015年4月23日  
国内外の別: 外国

〔その他〕  
ホームページ等  
作成中

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
稲岡 健ダニエル (INAOKA, Ken Daniel)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 10623803

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
北 潔 (KITA, Kiyoshi)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 90134444

原田 繁春 (HARADA, Shigeharu)

京都工芸繊維大学・大学院工芸科学研究  
科・教授

研究者番号：80156504

齋本 博之 (SAIMOTO, Hiroyuki)

鳥取大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：20186977

本間 光貴 (HONMA, Teruki)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイ  
エンス技術基盤研究センター・チームリー  
ダー

研究者番号：10466039