

論文の内容の要旨

氏名：小山 亮祐

博士の専攻分野の名称：博士(生物資源科学)

論文題名：非糖ミミックなゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤による *N*-結合型糖鎖の制御に関する研究

糖鎖は、核酸やタンパク質に次ぐ第3の生命鎖とよばれ、様々な生命現象へ関与している。それら糖鎖のうち、タンパク質の *N*-結合型糖鎖は、伝達やタンパク質の品質・構造・機能の調整や細胞表面での情報提示などの生理作用を示す。本研究では、細胞間の情報伝達いわゆる細胞間コミュニケーション (CCC) における *N*-結合型糖鎖の役割に着目した。CCCにおいて、*N*-結合型糖鎖は他の細胞の表面に存在する糖鎖認識タンパク質への結合分子であり、細胞識別などを行っている。その *N*-結合型糖鎖を未成熟とすると CCC が障害され細胞接着不全が生じる。このような CCC 不全は、*N*-結合型糖鎖プロセッシングに関与するゴルジ体マンノシダーゼ (GM) の阻害により生じることが知られている。そこで、GM 阻害により *N*-結合型糖鎖の構造を制御し CCC を不全とする機構を、依然として治療が困難ながん腫瘍の治療へ適用する戦略を考案した。がん腫瘍は、自己複製能と分化能を示すがん幹細胞を通常がん細胞が取り囲み、抗がん剤が作用しにくく、残存したがん幹細胞から腫瘍が再構成される問題がある。そこで、GM 阻害剤をがん腫瘍に投与しがん細胞間の CCC 不全とすれば、がん腫瘍を崩壊させ露出したがん幹細胞に抗がん剤を投与すれば、腫瘍細胞を効率的に死滅させることができる。

このような戦略の達成を目指し、戦略の基盤となる新規 GM 阻害剤を探索・構造展開することにより創製し、本阻害剤を用いて *N*-結合型糖鎖の構造を制御し、がん細胞間の CCC を不全とすることを目的とした。

1. 新規非糖ミミックな GM 阻害剤の開発

1.1. GM 阻害剤探索系の構築

N-結合型糖鎖の制御には細胞内でも作用する強力な GM 阻害剤が必要となる。しかしながら、既知阻害剤は糖ミミック構造に基づく高い親水性に起因する低い膜透過性のため、細胞の生理活性発現に高い阻害剤濃度が必要になる。この膜透過性の問題を解決するため、既知阻害剤に対して様々な構造展開が行われ効果を上げているが、目指す抗がん戦略には既知 GM 阻害剤のような非ドラックライクな構造では不適であると判断し、意図しない作用標的が存在する懸念はあるが、阻害剤母核として非糖ミミック構造を選択することとした。

これまでに非糖ミミック構造を有する GM 阻害剤の報告はなく、目的とする GM 阻害剤を新たに開発する必要がある。しかしながら、その探索に必要な GM 阻害活性の測定系の報告もなかった。そこで本研究では、ヒト培養細胞レベルで GM 阻害剤探索を可能とする2つの評価系の構築を行った。1つは、細胞内の GM を阻害すると、細胞内にハイマンノース (HM) 型糖鎖が蓄積することを利用し、HM 型糖鎖を特異的に認識する蛍光標識レクチン (コンカナバリン A; Con-A) を用いて、細胞内の HM 型糖鎖を蛍光量として検出可能な GM 阻害活性評価系である。もう1つは、GM の阻害によって細胞内に蓄積した HM 型糖鎖が細胞表面に輸送されることを利用して、HM 型糖鎖の増加に起因する細胞接

着不全を細胞長の縮小率として評価する系である。これら 2 つの系を既知阻害剤によって検証した結果、阻害剤濃度依存的な HM 型糖鎖の減少と細胞縮小率の増加が認められたことから、両系を組み合わせ GM 阻害剤探索系として以降の研究に用いた。

1.2. 化合物ライブラリからの探索

構築した GM 阻害剤探索系を用いて、医薬品や天然化合物など多様な母核構造を特徴とする理化学研究所天然化合物ライブラリから阻害剤探索を行い、阻害剤濃度依存的な HM 型糖鎖の減少と細胞縮小率の増加が認められた 4 化合物をヒット化合物として得た。ヒット化合物のうち 3 化合物は医薬品であり、そのうち 2 化合物は、核内受容体であるエストロゲン受容体を作用標的とする抗がん剤、タモキシフェンとラロキシフェンであり、他 1 化合物はシクロオキシゲナーゼ 1 と 2 を作用標的とする抗炎症剤であるスリンダクであった。残り 1 化合物は、生理活性等の報告のない化合物であり、AR501 と命名した。これら化合物は非糖ミミックな構造を有し、医薬品として適切な分子量・極性表面積 (tPSA)・分配係数 (cLogD)・不斉中心の数を有していたことから、ドラックライクな構造であると判断し、既知阻害剤の問題点を解決した新規の GM 阻害剤候補化合物として選抜した。

これらヒット化合物の GM 阻害活性を既知阻害剤キフネンシンと比較した結果、タモキシフェン・ラロキシフェン・AR501 は、キフネンシンの 1/10 の濃度 (10 μ M) で同程度以上の強い阻害活性を示したが、スリンダクはキフネンシン同等の阻害活性であった。また、すべての化合物が阻害活性発現濃度において細胞毒性を示さなかったことから、意図しない作用標的はないと推測された。これらの結果より、スリンダクを除くタモキシフェン・ラロキシフェン・AR501 を GM 阻害剤候補化合物として選抜した。

1.3. ドラックリポジショニングの観点からのヒット化合物の選抜

選抜した 3 化合物のうち、タモキシフェン・ラロキシフェンの主たる生体内標的はエストロゲン受容体であり、本研究より GM が副たる生体内標的であることを明らかにした。本結果を、医薬品活用の創薬アプローチの 1 つであるドラックリポジショニングの観点へ当てはめると、これら 2 化合物の構造を基盤とした化合物展開を行うことで、迅速かつ低コスト、かつ薬物動態に対する知見の蓄積からある程度の安全性が担保された GM 阻害を基盤とする医薬品開発が可能となる。しかしながら、主作用と GM 阻害の両方に基づく複雑な生理活性解析を避けるため、候補化合物からタモキシフェン・ラロキシフェンを排除し、現時点で生理活性等の報告のない、つまり生体内標的が現時点は報告されていない AR501 を GM 特異的阻害剤の候補化合物として選抜した。

2. ジフェニルプロピルアミン骨格を有する GM 阻害剤 (AR501) の開発

2.1. AR501 誘導体の分子設計

選抜した AR501 をもとに N-結合型糖鎖構造の制御を行うためには、AR501 の GM 阻害活性の向上と構造活性相関の解明が必要となる。そこで AR501 誘導体の分子設計を行った。AR501 誘導体の分子設計は、*in silico* における GM と AR501 の結合様式解析をもとに実施した。*In silico* 解析は、ヒト由来 GM の立体構造が報告されていないため、ヒト由来酵素と相同性の高いマウス由来 GM (Mouse Golgi α -1,2-mannosidase IA) を用いた。本酵素と AR501 のドッキングモデルを構築・解析した結果、GM 活性部位内の 3 つの空間に AR501 が一定の結合様式を取らずに、フレキシブルに結合するモデルが得られた。

そこで、酵素活性部位との結合に関与が予測された AR501 の 3 つの部位の構造を変更した 9 つの誘導体を設計した。これらの誘導体を合成し、GM 阻害活性を評価することにより、効果的な構造活性相関の解析が可能となる。

2.2. AR501 誘導体の合成

設計した 9 種類の誘導体の合成は、芳香族アルデヒドを出発原料とし、シアノ酢酸エチルとの縮合反応によりシアノ基を導入するとともに 3 炭素増炭し、得られたオレフィンにグリニャール試薬で芳香族置換基を導入した。得られた化合物のエステルを加水分解し、得られたカルボキシ基を脱炭酸反応にて除去した。得られた化合物のニトリル基を還元しアミノ基とした後に、芳香族アルデヒドとイミンを形成した。得られたイミンを還元し 2 級アミンとすることで、設計した 9 種類の誘導体を、それぞれ 7 工程・総収率約 50 % で合成することに成功した。合成した化合物の構造と純度は、核磁気共鳴分析・質量分析・元素分析により確認した。本方法は、酵素との結合に重要であると予測されたと 3 つの部位に任意の構造を導入可能な合成法であり、必要に応じてさらなる構造展開が可能となる。

2.3. AR501 誘導体の構造活性相関解析に基づく GM 阻害剤の選抜

合成した 9 種の誘導体の GM 阻害活性の評価は、前項で構築した 2 つの評価系を用いて行った。その結果、AR521・AR524・AR525 はキフネンシンの 1/10 の濃度 (10 μ M) で、GM 阻害による細胞内 HM 型糖鎖がキフネンシンの約 50 % 増加した。次に、GM 阻害に基づく細胞接着不全に由来する細胞の形態変化を観察した。その結果、AR521・AR524・AR525 は、キフネンシンの 1/10 の濃度 (10 μ M) で、キフネンシンと同様に細胞接着不全に基づく細胞縮小が生じ、その値はキフネンシンの約 2 倍であった。最後に、AR521・AR524・AR525 の細胞毒性評価を行い、意図しない標的の確認を行い、これらの化合物が GM 阻害活性を示した化合物濃度での細胞毒性を示さなかったため、これらの化合物が意図しない細胞内標的を持たない GM 阻害剤であると確認した。

次に、医薬品リード化合物が有すべき化学特性に基づき、AR521・AR524・AR525 の選抜を行った。その結果、潜在的な毒性発現リスクが高い tPSA が極端に小さい AR521 を排除した。最後に、AR524・AR525 の構造を比較し、酵素活性部位に対してより多くの水素結合形成が可能と考えられる AR524 を GM 阻害剤として選抜した。

3. AR524 の阻害作用点の解析

3.1. GM 阻害による細胞内 HM 型糖鎖の分布変化

ヒト細胞中において N-結合型糖鎖プロセッシングに関与するマンノシダーゼは、小胞体マンノシダーゼ (ERGM)・3 種類のゴルジ体マンノシダーゼ I (GMIA1, GMIA2, GMIC1)・ゴルジ体マンノシダーゼ II (GMII) が存在する。そこで、AR524 がいずれの細胞内マンノシダーゼを阻害するか、阻害作用点解析を行った。

阻害作用点の解析は、GMI の 3 種のアイソザイムは区別できないが、GMI 阻害剤であるキフネンシンと AR524 を用いて、それらをそれぞれ作用させた際の細胞内の HM 型糖鎖の分布を比較することで行った。細胞内 HM 型糖鎖の分布は、蛍光標識 Con-A を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、阻害剤未投与のコントロール細胞では通常の糖鎖の生合成経路に見られる HM 型糖鎖が核周辺にある小胞体・ゴルジ体に分布していることが観察された。キフネンシンを投与した細胞では、HM 型糖鎖が核周辺だけでなく細胞全体に分布していることが観察された。AR524 を投与した細胞におい

ても、キフネンシンと同様に HM 型糖鎖の細胞全体への分布が観察された。以上の結果から、AR524 は N-結合型糖鎖プロセッシングに関与するマンノシダーゼのうち、3 種のアイソザイムは区別できないが少なくとも GMI を阻害することが示唆された。

3.2. GM 阻害による細胞表面糖鎖の分布変化

AR524 のより詳細な AR524 の阻害作用点を明らかにするために、GM 阻害によって細胞表面へ輸送される糖鎖の種類と分布変化について複数の蛍光標識レクチンを用いたフローサイトメトリー分析を行った。細胞表面糖鎖の検出に用いた蛍光標識レクチンは、HM 型糖鎖を認識する Con-A・HM 型糖鎖の認識構造が Con-A とは異なる Galanthus Nivalis レクチン (GNL)・成熟型糖鎖を認識する Datura Stramonium レクチン (DSL) を用いた。その結果、GMI 阻害剤であるキフネンシンを投与した細胞では、DSL を用いたときに細胞表面の成熟糖鎖の減少、Con-A と GNL を用いたとき、それぞれにおいて HM 型糖鎖の増加が観察された。一方、AR524 を投与した細胞では、DSL と GNL を用いた際にはキフネンシンと同様の傾向を示したが、Con-A を用いた際には、キフネンシンとは異なり HM 型糖鎖の減少が観察された。この結果は、AR524 がキフネンシンとは異なる構造の HM 型糖鎖を細胞表面に増加させていることを示している。この結果をレクチンの結合特性から解析すると、AR524 の投与によって蓄積した HM 糖鎖が GMI の 3 種のアイソザイムの基質となる構造を持つことが推定され、AR524 の阻害作用点はそのどれかであることが予測された。

以上の結果、GMI 阻害において AR524 がキフネンシンと異なる阻害作用点を持つことを明らかにし、GMI の 3 種のアイソザイムの阻害標的の違いを推定したが、ERGM・GMII を含めた明確な阻害点を特定するには至らなかった。

4. 総括

本研究では、GM を標的酵素とし、その阻害剤を探索・構造展開により開発し、本阻害剤を用いて糖鎖構造を制御し、CCC を不全とする新たながん戦略へ応用することを目的として研究を行い、既知阻害剤の化学特性・創薬展開の困難さを解決した新規非糖ミミック GM 阻害剤として AR501 を見出した。AR501 から医薬品リード化合物を得るため、*in silico* 解析・有機合成法の確立・構造展開と構造活性相関解析を実施し、より合目的な特性・活性を有する AR524 を得た。AR524 を代表化合物として、AR501 誘導体の阻害作用点について検討した結果、GMI を阻害し、その 3 種のアイソザイムのどれかを阻害作用点とすることが予測されたが、明確な阻害点を特定するには至らなかった。現在、作用点を決定するため、CCC に関与するインテグリン糖鎖の高分解能質量分析器を用いた解析を実施している。

本研究で創製した AR501 誘導体を用いることで、単層培養細胞での細胞表面 N-結合型糖鎖の構造制御作用は確認できたことから、今後は 3 次元培養細胞・組織・臓器・個体レベルでの GM 阻害活性とその生理作用、さらに CCC を不全とするのかの解析が重要となる。これらを解決することで、AR501 誘導体を基盤とした N-結合型糖鎖構造制御に基づき、がん細胞間の CCC を不全とすることで、考案した抗がん腫瘍戦略を達成できると考えている。