

論文の内容の要旨

論文題目 NPP family を標的とした創薬化学研究

氏 名 川 口 充 康

【序論】

タンパク質は生命を構成する基本分子であり、ヒトゲノム解析が完了した現在においてその構造・機能解析が益々重要である。タンパク質の機能解析研究において、以前から特異的に活性を制御する有機小分子阻害剤が活用されてきた。近年、生命科学の基礎研究においては KO mouse や RNAi を用いた knockdown が活用の幅を広げているが、瞬時に作用を発現する有機小分子阻害剤の役割は臨床の現場を含めて一段と重要になってきている。

本研究では HTS を利用した創薬化学研究を大学において行っているが、その意義は多くの製薬会社が手を出せない未開の創薬ターゲットを標的とする点にある。残された未解析のタンパク質機能を解明し、新たな創薬ターゲットの提案を行うことは薬学アカデミア研究における責務である。

本研究では、NPP family と呼ばれる細胞外における核酸やリン脂質の代謝に関与するエクト型加水分解酵素を標的として選択した (Fig. 1)。その中で、native な基質が LPC (lysophosphatidylcholine) と共通であり、酵素活性も類似する NPP2/lysoPLD と NPP6/lysoPLC に着目し、それらの特異的かつ高感度活性検出系の構築および阻害剤の開発を行った。

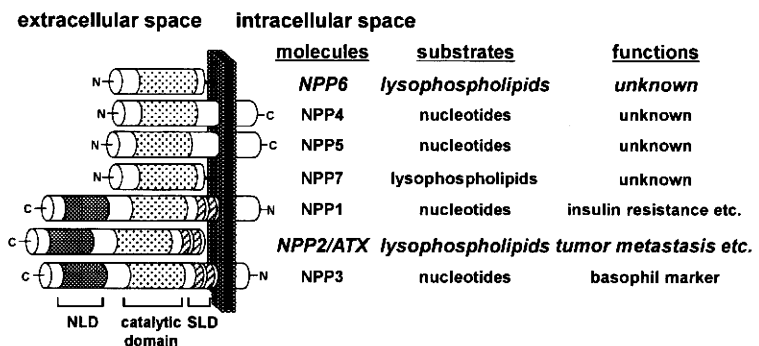


Figure 1. Domain structures and functions of NPP family.

【本論】

1. NPP6 活性検出高感度蛍光プローブおよび阻害剤開発¹

NPP6 は choline を特異的に認識し lysoPLC 活性を示す加水分解酵素であるが、その機能や生理的意義に関する研究は現在までにほとんど報告がない。私は、NPP6 活性が測定できる高感度な蛍光プローブおよび NPP6 特異的阻害剤が開発できれば、NPP6 の機能解析に関する研究が大きく前進すると考えた。

NPP6 は NPP2 と類似する酵素活性を示すため、それを精確に見分けることが必須である。従って、NPP6 のみを基質として認識する酵素認識部位を探索すべく報告のある基質の構造を検討した結果、phosphorylcholine (PC) が最適であると予想された。そこで、PC を NPP6 認識部位として持つ TG-mPC を NPP6 活性検出蛍光プローブとして分子設計した。TG-mPC は、**Fig. 2 (A)** に示すように lysoPLC と lysoPLD の酵素活性に基づいて反応した結果、反応生成物が異なることが想定され、NPP6 の基質になった場合のみ大きな蛍光上昇を示すと予想した。

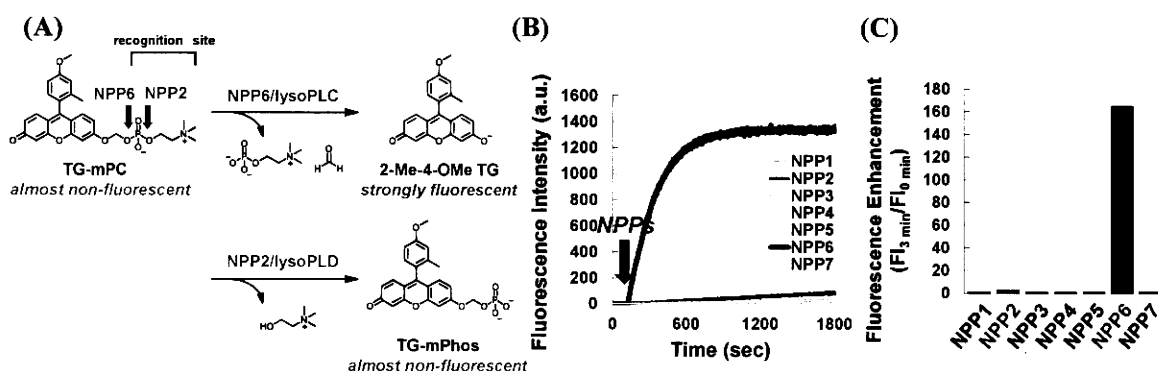


Figure 2. (A) Strategy to selectively detect NPP6 activity. (B, C) Reactivity and selectivity of TG-mPC toward recombinant NPP family.

TG-mPC を 5 steps で合成し NPP family (NPP1-7) との反応性を検討した結果、NPP6 特異的に大きな蛍光強度上昇を示すことが明らかになった (**Fig. 2 (B, C)**)。また、生細胞を用いて特異的に NPP6 活性をイメージングすることにも成功した。

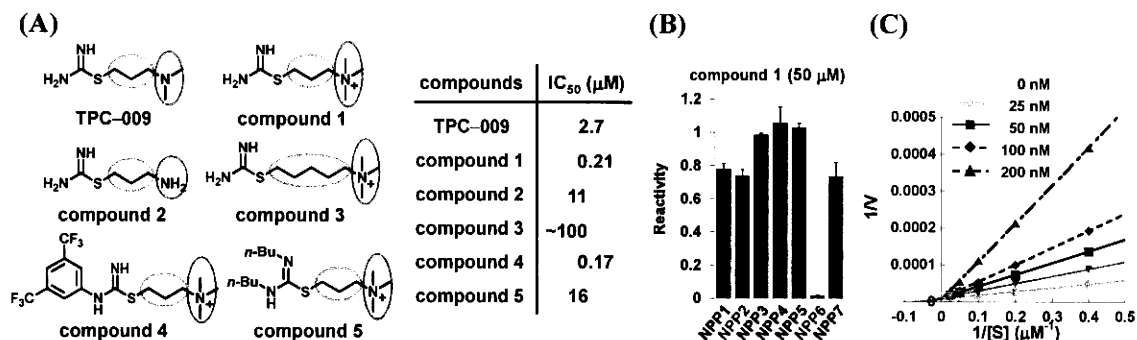


Figure 3. (A) SAR study of TPC-009 analogues as NPP6 inhibitors. (B) Selectivity of compound 1 toward NPP family. (C) Lineweaver-Burk plots, showing competitive inhibition by compound 1.

物)を行った。ヒット化合物の中から、選択性・阻害活性から特に TPC-009 に着目し構造活性相関を検討した (Fig. 3 (A))。その結果、リンカーの長さやアミンの置換基が阻害活性に大きな影響を与えることが明らかとなり、最適化された compound 1 が potent かつ selective な競合的 NPP6 阻害剤として得られた (Fig. 3 (B, C))。

TG-mPC は lysoPLC と lysoPLD 活性を正確に見分けられる高感度蛍光プローブであり、compound 1 は世界初の NPP6 阻害剤である。

2. NPP2 活性検出高感度蛍光プローブおよび阻害剤開発

NPP2/Autotaxin はがん細胞における細胞遊走活性化因子として同定され、現在では血中で LPC から lysophosphatidic acid (LPA) を産生する酵素と考えられている。産生された LPA は LPA 受容体を介して細胞内に様々なシグナルを伝達することで多岐に渡る生理的・病理的機能を担っている。特に、がんの転移や浸潤に関与することが強く示唆されていることから、その阻害剤は新たな作用機序に基づく抗がん剤になる可能性が高いと考えられる。そこで、私は新規骨格を持つ NPP2 阻害剤の開発を目的に研究に着手した。

まず、先述の NPP6 活性検出プローブの開発戦略に倣い、新たな NPP2 活性検出蛍光プローブの開発を行った (Fig. 4 (A))。開発した TG-mTMP は NPP2 活性を高感度に検出することが可能であった。そこで、TG-mTMP を用いて大規模スクリーニング (81,600 化合物) を行うことにより NPP2 阻害剤骨格を探索した。その結果、10 μM において 90%以上阻害する化合物が 17 化合物見出され、その中から特に compound 6 ($\text{IC}_{50} = 180 \text{ nM}$) に着目した (Fig. 4 (B))。compound 6 と NPP2 の複合体の結晶構造解析を行った結果、compound 6 は NPP2 の hydrophobic pocket に結合していることが分かったが、同時に NPP2 活性中心の Zn^{2+} および Thr209 と相互

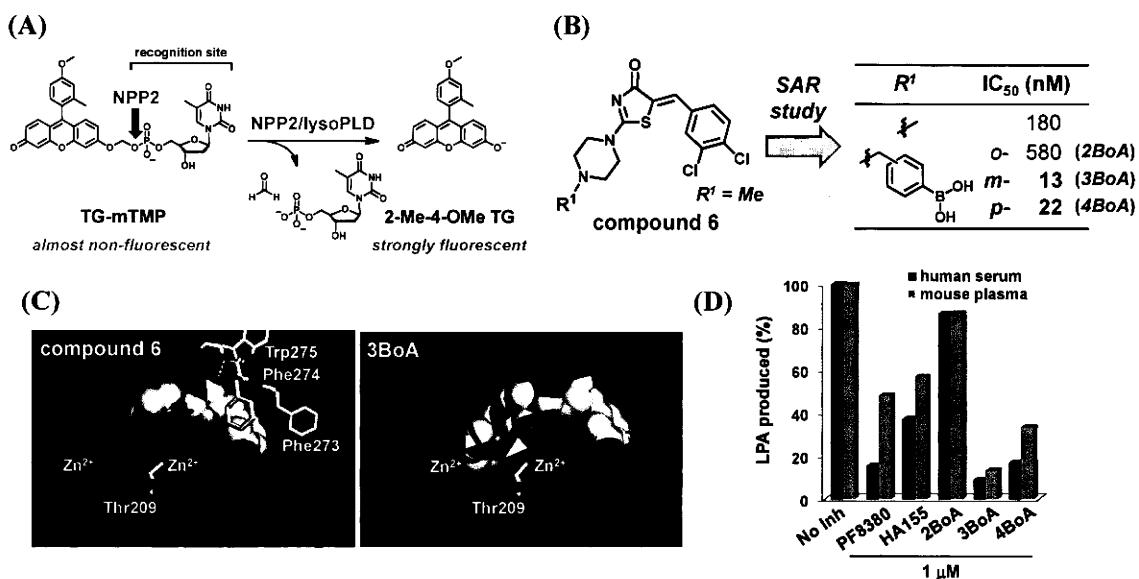


Figure 4. (A) Strategy to detect NPP2 activity. (B) SAR study of compound 6 analogues. (C) Active site structures of NPP2-compound 6 or 3BoA complexes. (D) Inhibition of LPA production.

作用していないことも分かった (Fig. 4 (C))。この知見を基に構造活性相関を検討し、より強い阻害活性を示す 3BoA ($IC_{50} = 13 \text{ nM}$) の創製に成功した (Fig. 4 (B))。3BoA は結晶構造解析より狙い通り Zn^{2+} および Thr209 に配位、結合することが示された (Fig. 4 (C))。さらに、3BoA は報告されている NPP2 阻害剤 (PF8380, HA155) と比較して、ヒト血清中における LPA 産生をより強く抑制した (Fig. 4 (D))。

【結論】

本研究で、NPP family を標的としてその酵素活性を高感度に検出する蛍光プローブおよび阻害剤の開発に成功した。今後、これらの強力なツールを用いて NPP family の機能解析が大きく進展することが期待される。特に、NPP2 の阻害剤は報告されている中で最も強い阻害剤であり、がん等の疾患治療薬へ繋がる。

【発表文献】

¹ Kawaguchi, M., et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12021-12030.