

審査の結果の要旨

氏名 川口 充康

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・機能解析の重要度が高まっている。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。本研究は、このような有機小分子阻害剤の探索・開発を目的とした創薬化学研究であり、その最大の意義は、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。

申請者川口充康は、本研究において、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、その中で、native な基質が LPC (lysophosphatidyl-choline) 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に成功した。

1. NPP6 活性検出高感度蛍光プローブおよび阻害剤開発

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。川口は、NPP6 活性が測定できる高感度な蛍光プローブおよび NPP6 特異的阻害剤を開発することにより、NPP6 の機能解析に関する研究が大きく前進すると考え、本研究に着手した。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の検討を行い、phosphorylcholine (PC) が最適であると予想した。そして、PC を認識部位として持つ NPP6 活性検出蛍光プローブとして TG-mPC を分子設計し、5 steps で合成した。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となった。更に、本プローブを用いることにより、生細胞イメージングにおいても、NPP6 の活性を特異的に検出することが可能であることが確かめられた。

次に、NPP6 阻害剤の創製を行うために TG-mPC を用いた大規模スクリーニング (80,000 化合物) を行い、ヒット化合物の中から、高い選択性・阻害活性を有する TPC-009 という化合物に着目し、構造活性相関を検討した。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を明らかにし、最適化された compound 1 を potent かつ selective な競合的 NPP6 阻害剤として得ることに成功した。

以上の研究の結果開発された TG-mPC は NPP6 の活性を選択的に検出でき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) を産生する酵素であると考えられている。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。そこで、川口は新規骨格を持つ NPP2 阻害剤の開発を目的として研究を行った。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。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り、この 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、10 μM において 90%以上阻害する化合物を 17 化合物見出した。その中から特に compound 6 ($\text{IC}_{50} = 180 \text{ nM}$) に着目し、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 活性中心の Zn^{2+} および Thr209 と相互作用せず、近傍の hydrophobic pocket に結合していることが明らかとなった。この結果を受けて、更に構造活性相関の検討を行い、hydrophobic pocket に加えて Zn^{2+} および Thr209 に配位、結合することでより強い阻害活性を示す 3BoA を創製した。3BoA は分子設計どおり compound 6 よりも更に強い NPP6 阻害活性 ($\text{IC}_{50} = 13 \text{ nM}$) を有し、ヒト血清中においても、NPP2 による LPA 産生を強力に抑制することが確かめられた。その阻害活性は現在までに報告されている NPP2 阻害剤の中で最も強いものであり、がん等の疾患治療薬へ繋がることが強く期待される。

以上にまとめる本研究において、川口は 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を開発することに成功した。本研究成果は、NPP family の活性の異常が観察されるがん等の疾患の治療薬開発に対する非常に有用な指針を与えるものであり、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。これらの成果は博士(薬学)にふさわしい成果と審査委員会で評価された。