

博士論文

Pathway-Oriented Screening 法による
生細胞の代謝活性の評価とその阻害剤の探索

柳 光一

博士論文

Pathway-Oriented Screening 法による
生細胞の代謝活性の評価とその阻害剤の探索

東京大学大学院薬学系研究科

薬科学専攻

薬品代謝化学教室

柳 光一

目次

第一章 序論

第一節 High throughput screening 系	4
第二節 酵素活性の評価	8
第三節 本研究の目的	12

第二章 Pathway-Oriented Screening (POS)

第一節 Pathway-Oriented Screening (POS)	14
第二節 細胞外代謝物蛍光検出プローブの開発	17
第三節 小括	31

第三章 Methylglyoxal (MG) 代謝系阻害剤の探索

第一節 がんと Methylglyoxal (MG) 代謝系	33
第二節 Methylglyoxal (MG) 代謝系阻害剤の探索	43
第三節 小括	66

第四章 アミノ酸代謝系阻害剤の探索

第一節 標的代謝経路の探索	69
第二節 アミノ酸代謝系 (Gln → Asn) 阻害剤の探索	79
第三節 小括	102

第五章 総括と今後の展望

第一節 総括	104
第二節 今後の展望	106

実験の部	108
------	-----

参考文献	139
------	-----

第一章 序論

第一章 序論

第一節 High Throughput Screening 系

大規模化合物ライブラリーを用いた high throughput screening は、細胞の表現型を制御し、疾患を治療する化合物を探索する上で非常に強力な手法である。実際に 1999 年から 2008 年の間に承認された薬剤 239 種類のうち、158 種が high throughput screening によって見出された化合物である。さらに、75 種類の first-in-class の新規薬剤のうち、28 種 (37 %) が phenotype-based screening (生細胞を用いて細胞増殖能等の表現型を指標に評価する high throughput screening)、17 種 (17 %) が target-based screening (標的の精製酵素を用いた *in vitro* 系で酵素活性を評価する high throughput screening) によるアプローチでその候補化合物が見出されていることから^{1,2}、high throughput screening という手法が大きく創薬に貢献してきたことが窺える (Table 1-1-1)。

Table 1-1-1. Discovery of first-in-class new molecular entities by therapeutic area².

Disease area	Target-based screening	Phenotypic screening	Biologics
Infectious diseases	3	7	1
Immune	1	0	6
Cancer	5	3	8
Central nervous system	1	7	1
Metabolic	3	2	2
Cardiovascular	2	3	0
Gastrointestinal	1	1	1
Others	1	3	1
Rare diseases	0	2	5

製薬会社等で行われる high throughput screening によって開発される薬剤の主な標的として酵素が挙げられる³ (Fig. 1-1-1. 参照)。生体内では数多の酵素反応が進行しており、タンパク質のリン酸化、バイオマスやエネルギー産生など様々なはたらきを酵素が担うことで細胞機能を維持している。従って酵素活性の異常は正常な細胞機能を阻害し、疾患に直結しうるため、これを制御する薬剤の開発は疾患を治療する上で非常に重要である。

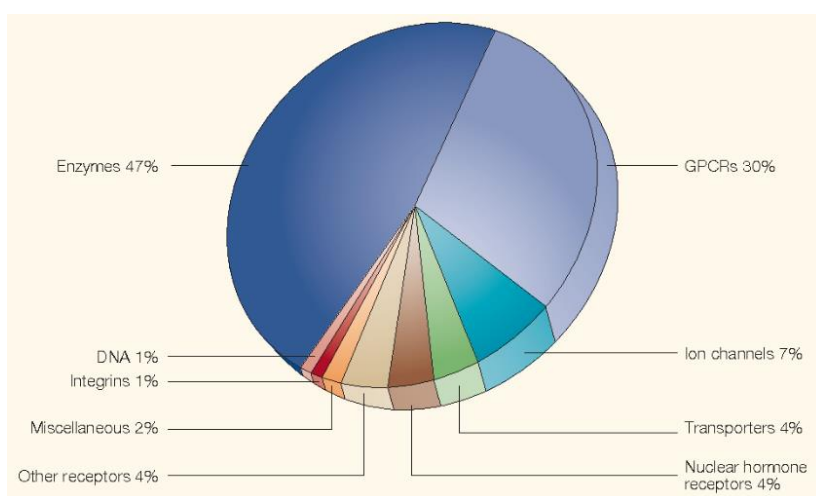


Fig. 1-1-1. Marketed small-molecule drug targets by biochemical class. GPCRs: G-protein-coupled receptors³.

酵素活性と疾患が関わる代表例としてがんが挙げられる。数ある疾患の中でもがんは治療が最も困難な病気の1つであり、原発巣、原発細胞種の違いによってがん細胞の性質は多様なため、これを1つの病気として捉えることが困難である。しかしながら、無秩序な増殖を繰り返すというがん細胞共通の性質があり、細胞増殖に必要なエネルギーやバイオマスの産生、レドックスバランスの調整に対する要求性が高いため、生体内で数多に存在する酵素の中でもこれらに関わる酵素活性の異常に着目することで、多様ながん細胞に共通の治療標的を見出すことができる可能性が示唆されており、近年これを支持する研究結果が得られている⁴⁻⁶。実際に解糖系酵素やアミノ酸代謝系酵素にあげられるような、生体内の小分子を代謝する酵素の多くはがんの創薬標的とされており、これらの活性を制御する薬剤の開発はがんの治療戦略の1つとして有用である (Table 1-1-2)⁴⁻⁶。

Table 1-1-2. Targeting metabolic enzymes as a strategy to block biosynthesis or induce energy stress.

創薬標的	阻害剤	がん種	開発状況
解糖系関連			
GLUT	WZB117	肺がん (A549)	非臨床
PKM2	TLN-232	メラノーマ (stage III or IV)	Phase2で中止
LDH	FX11	膵臓がん (TP53変異)	非臨床
MCT1 etc.	AZD3965	悪性リンパ腫 (パーキットリンパ腫,びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)	Phase1進行中
TCA回路関連			
PDK1	DCA	膀胱がん (尿路上皮)	Phase1 (肝機能改善薬としては販売)進行中
IDH etc.	AG-120	急性骨髄性白血病 (IDH1変異)	承認
アミノ酸代謝系関連			
GLS	CB-839	結腸直腸癌、非肺小細胞がん (KRAS変異)	Phase1 (CDK4/6阻害剤 Palbociclibと併用)進行中
L-Asn取り込み etc.	L-Asparaginase	急性リンパ芽球性白血病	承認

しかしながら、重要な創薬標的とされながらも薬剤の開発が進行していない酵素も存在し、その理由の1つとしてそのような酵素の活性を評価するアッセイ系が不足していることが挙げられる。特にこれら生体内小分子を基質として代謝する酵素の活性を生細胞系で評価する high throughput screening 系の開発がほとんど行われていないということが現状である。

第二節 酵素活性の評価

前節で、生細胞系で酵素活性を評価するアッセイ系がほとんど開発されていないことを述べたが、一般に酵素活性は生細胞中で行う *in cellulo* の評価法と精製酵素を用いた *in vitro* での評価法が存在し、“生体内を反映した形” で酵素活性を評価するには、*in cellulo* での評価の方が *in vitro* での評価よりも望ましいと考えられる。細胞内において、酵素の機能はタンパク-タンパク相互作用や翻訳後修飾、基質や補因子の濃度変化等によって動的に、複雑に制御されているため、“*in cellulo*” と “*in vitro*” では酵素を取り巻く環境は大きく異なっているからである (Fig. 1-2-1)^{7,8}。

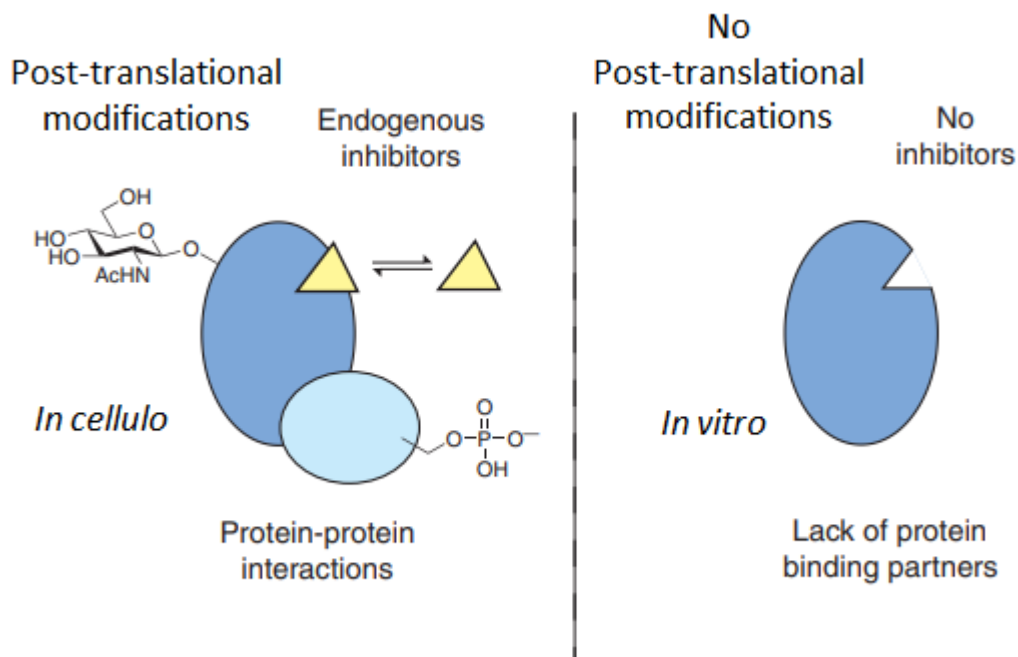


Fig. 1-2-1. Comparison of the *in cellulo* and *in vitro* environments typically experienced by proteins, highlighting several natural modes for their post-translational regulation. (*Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 130-142. より一部改変)

例えば、Pyruvate kinase は解糖系の律速酵素であり、そのアイソザイム PKM1 は活性の高い 4 量体で存在する一方、PKM2 は活性の低い 2 量体と活性の高い 4 量体で存在する。がんにおいて PKM2 の発現量が高いことが知られており、解糖系酵素として phosphoenolpyruvate を pyruvate へ変換するほか、二量体の PKM2 は核内に移行してプロテインキナーゼとしてはたらき、がんの生存に有利な状況を作り出すことが知られている⁹。PKM2 の解糖系酵素としての活性は細胞内 L-serine によってアロステリックに制御されることが知られている。具体的には L-serine は解糖系から分岐する生合成経路によって 3-phosphoglycerate を出発物質に合成されるが、細胞内に L-serine が十分量存在する場合は PKM2 を活性化することで解糖系を亢進する一方で、細胞内 L-serine 濃度が低下すると PKM2 の活性が低下し、取り込んだ glucose は L-serine の生合成系へ消費されるようにシフトする¹⁰。がんでは酸素が十分に存在している状況においても、解糖系を利用して ATP 産生を行う現象 (Warburg 効果) が 1924 年に発見されて以降、解糖系をはじめとしてがん代謝に関する研究は行われてきたが、近年このような L-serine 生合成系と解糖系代謝経路とのクロストークをはじめとして新たな知見が得られており、未だに生体内における酵素活性制御への理解は十分ではない。

従って、単一精製酵素を用いた *in vitro* の検討で得られる情報だけではその酵素の生体内におけるはたらきを説明するには不十分であると言える。生細胞を用いることで標的酵素のタンパク-タンパク相互作用や細胞内局在などの情報は失われることはなく、生体内を反映した形で標的酵素の活性を評価することが可能であると考えられる (Fig. 1-2-2)。しかしながらその一方で、細胞内の数多ある酵素の中から目的の酵素の活性のみを観察することは非常に困難である⁸。

in vitro vs *in cellulo*

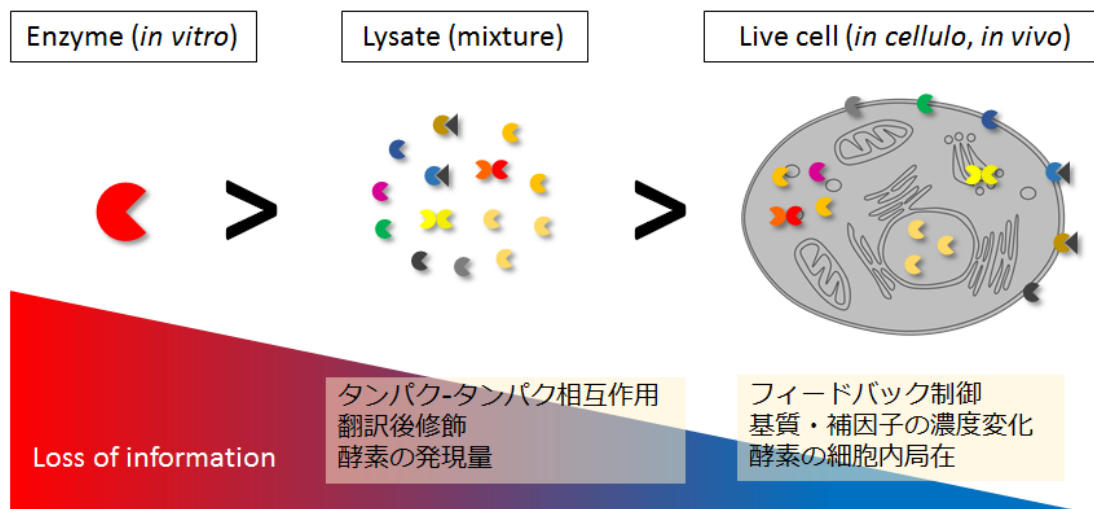


Fig. 1-2-2. The three representative platforms used to study enzyme functions. (J.

Biochem. **2019**, *in press* より一部改変)

これに対して、細胞の“生きた状態”を保ちながら特定の酵素活性を可視化する優れたツールとして、有機小分子蛍光プローブが挙げられる。酵素反応部位と蛍光色素を組み合わせた分子設計を施し、基質アナログとしての蛍光プローブを開発することにより、生細胞系で特定の酵素活性を評価することが可能である (Fig. 1-2-3)¹¹。また、蛍光検出は、多検体のサンプルをスループット高く検出することが可能であるため、high throughput screening 系の開発に広く用いられてきた。

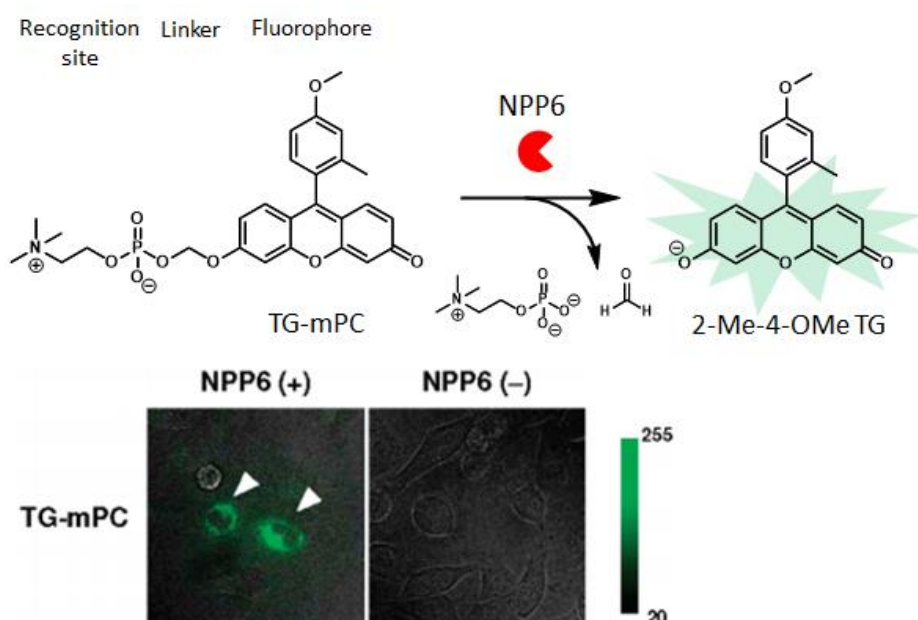


Fig. 1-2-3. The fluorescent probe to monitor NPP6 activity in live cells.¹¹

しかしながら、解糖系や TCA 回路に関わるような、糖やアミノ酸およびその代謝物をはじめとする生体内小分子に対してリン酸化や異性化、脱炭酸反応などをおこなう酵素については、その基質認識能の問題や酵素反応に伴う構造変化を蛍光特性への変化に繋げることの困難さから、基質アナログとして機能する蛍光プローブの開発は非常に困難であり、従ってこれらの代謝活性を生細胞系で評価する実験系はこれまでにほとんど開発されていない。

第三節 本研究の目的

第二節までで、がんの創薬標的とされる酵素でありながら、その活性を生細胞系でスループット良く評価する技術が乏しいということを概説した。

このような生細胞系で活性評価が困難な酵素に対して生細胞で有効な阻害剤を探索するため、本研究では、生細胞系で生体内小分子を代謝する代謝系の活性をハイスループットに評価する汎用性の高いアッセイ系を構築することとした。

第二章 Pathway-Oriented Screening (POS)

第二章 Pathway-Oriented Screening (POS)

第一節 Pathway-Oriented Screening (POS)

ハイスループットに生細胞の代謝活性を評価するため、①生細胞を用いて特定の酵素 1 つではなく、ある代謝経路を標的とし、②この標的代謝経路を経て産生される小分子代謝物をカップルドアッセイによって選択的に *in situ* で蛍光検出する、という 2 つの概念を組み合わせた新たな生細胞ベースの high throughput screening 系を構築することを目指した。

①について、

ある基質を input として生細胞に添加し、その後代謝されて細胞外に放出された代謝物を output として検出する。この「output 量を input から output に至るまでの代謝経路の活性」として評価することを考えた。これにより複数の異なる細胞種間の代謝活性の違いを評価することが可能であり、その output 量の減少を指標に標的代謝経路の阻害剤探索として用いることができると期待される。例えばある化合物が標的代謝経路に関わる酵素を阻害した場合 output は減少することが推測される (Fig. 2-1-1)。

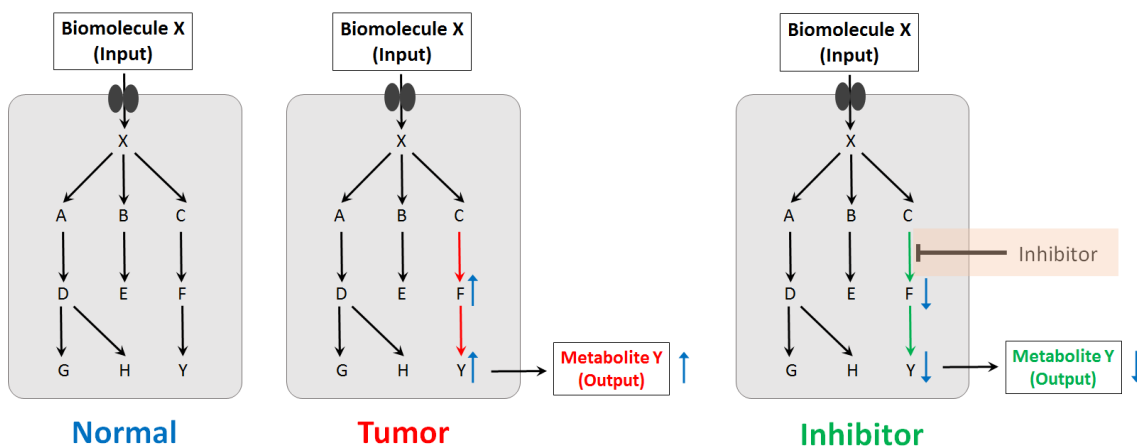


Fig. 2-1-1. Schematic view of Pathway-Oriented Screening (POS).

②について、

検出対象である細胞外代謝物 (output) を *in situ* で選択的に検出する手法として、その代謝物を選択的に代謝する酸化還元酵素を用いて NAD (P) H や H_2O_2 を産生させ、これらと反応することで蛍光上昇する蛍光プローブを用いて検出するカップルドアッセイを利用することを考えた (Fig. 2-1-2)。

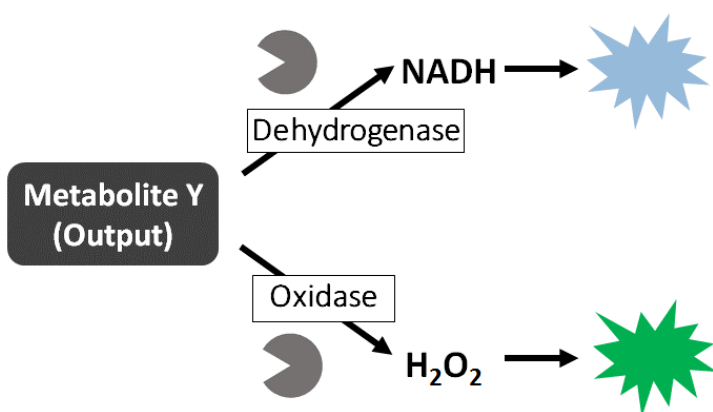


Fig. 2-1-2. Detection of metabolites by using coupled assay.

・カップルドアッセイについて

糖、アミノ酸をはじめとする多くの生体内小分子は、これらと選択的に反応する酸化還元酵素によって NAD (P) H や H_2O_2 へと変換することが可能であり、これら NAD (P) H や H_2O_2 と反応することで蛍光増大する色素を用いて目的の代謝物を蛍光検出することが可能である (Fig. 2-1-3)。カップルドアッセイの利点の 1 つとして、最終的に検出する物質は NAD (P) H や H_2O_2 であり、検出対象の代謝物に応じて用いる酵素を変えるだけで良く、色素側の構造を目的に応じて設計・合成する必要がないため、簡便に様々な代謝物を検出することが可能な点が挙げられる。

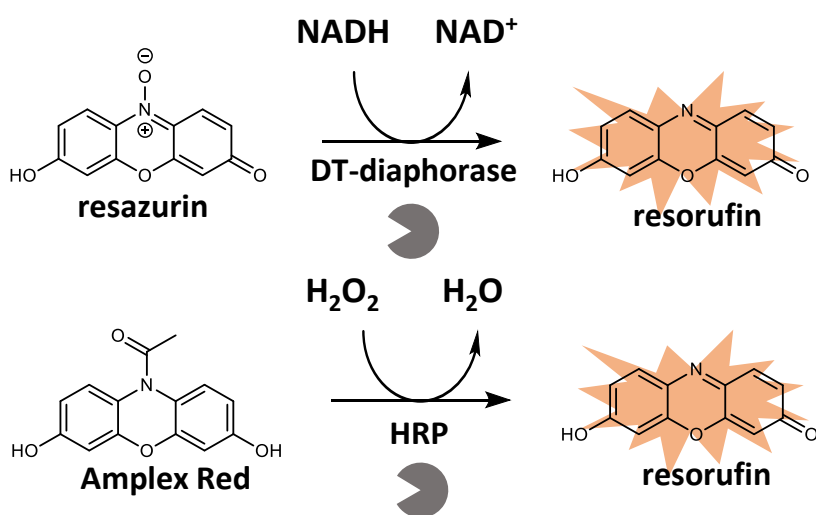


Fig. 2-1-3. The fluorescent probes for coupled assay.

本研究ではこのような、ある代謝経路 (Pathway) を標的として生細胞レベルで代謝活性を制御することが可能な化合物を取得する high throughput screening 系を Pathway-Oriented Screening (POS) と名付け、以降その実証実験を行った。

第二節 細胞外代謝物蛍光検出プローブの開発

第一節で述べた POS 法による評価は細胞共存下でその細胞が放出した目的代謝物を検出することが肝となる。細胞共存下で特定の細胞外代謝物を蛍光検出するには、カップルドアッセイに用いる蛍光プローブが細胞外で反応し、かつ反応前の蛍光プローブが細胞内へ透過しない必要がある。細胞内に蛍光プローブが透過してしまうと、細胞内に豊富に存在する NADH 等と酸化還元酵素を介して反応し、これに由来する蛍光シグナルはバックグラウンドシグナルとなり、細胞外代謝物に由来する蛍光シグナルの測定が困難になるためである (Fig. 2-2-1)。

そこで、本研究では水溶性を高めることで細胞外に留まり、細胞外代謝物を蛍光検出することが可能な新規蛍光プローブを開発することとした。

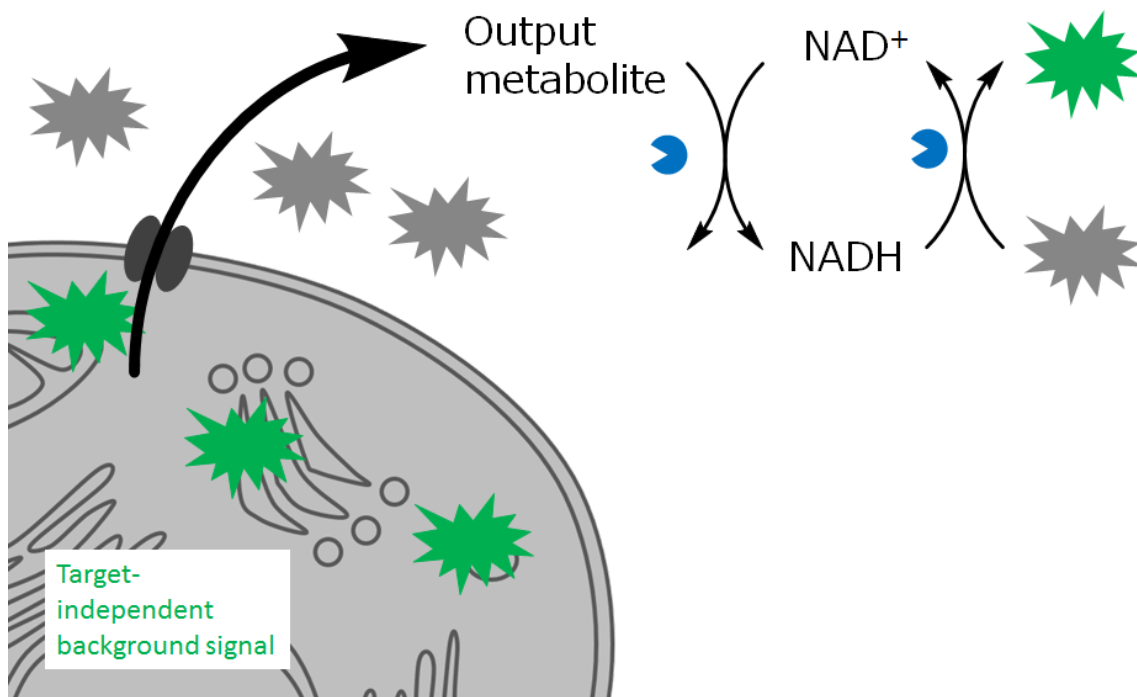


Fig. 2-2-1. The concept of extracellular metabolite detection module under the co-presence of live cells. The fluorescent probe is modified with hydrophilic substituents to make it membrane impermeable to avoid target-independent background signal.

細胞外代謝物は酸化還元酵素によって NADH や H_2O_2 に変換することとし、これらを検出する新規 NADH 検出蛍光プローブおよび新規 H_2O_2 検出蛍光プローブの開発を行った。

NADH 検出プローブとしては、酵素 DT-diaphorase が NADH を用いてキノン構造を還元する性質を利用し、蛍光色素クマリンとキノン構造を組み合わせたプローブを設計・開発した。以下 Fig. 2-2-2 のようなキノン構造は、還元されフェノール構造を形成すると分子内で速やかに環化する性質をもつため (trimethyl lock system)¹²、これを利用して NADH との反応後に蛍光色素クマリンからキノン構造が脱離して、蛍光上昇することを期待した。なお水溶性を高めるため、用いるクマリンにはスルホ基を導入している (Fig. 2-2-3)。

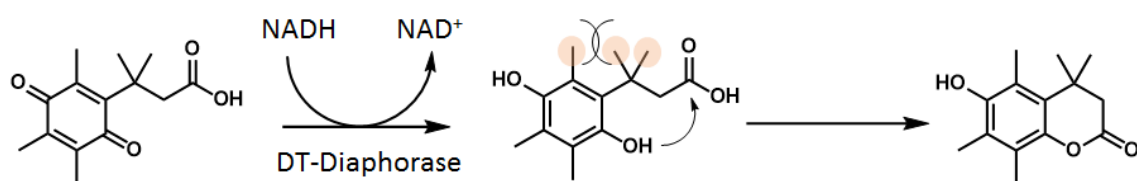


Fig. 2-2-2. Rapid reaction of a trimethyl lock acid to form a δ -lactone.

H_2O_2 検出プローブとしては、酵素 Horseradish peroxidase (HRP) を用いて H_2O_2 と反応し蛍光を発する蛍光プローブ APF¹³ を基にスルホ基を導入することで水溶性をさらに高めた構造を設計した (Fig. 2-2-3)。

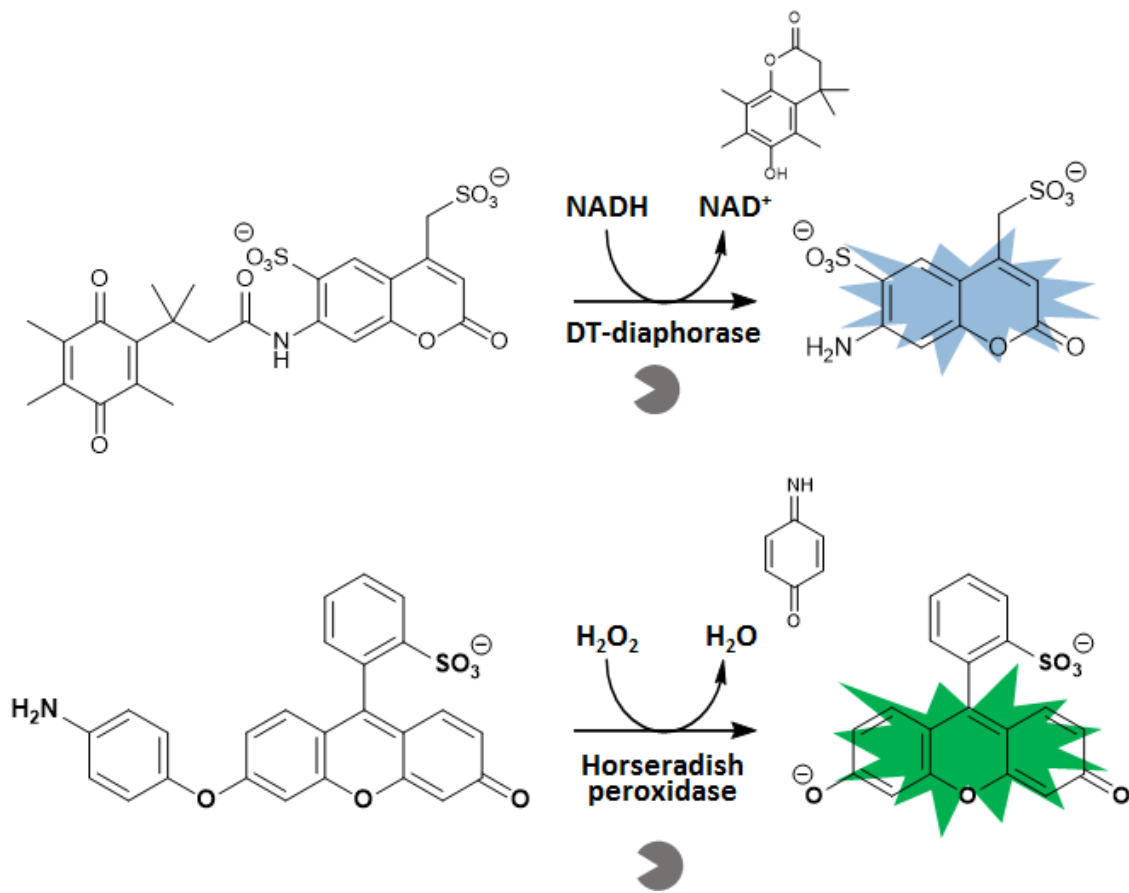
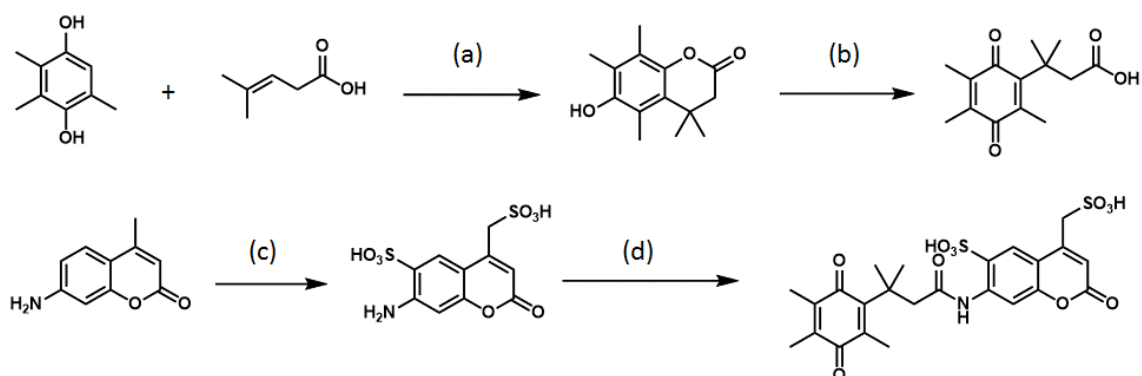


Fig. 2-2-3. Novel fluorescent probes to detect NADH or H₂O₂.

それぞれのプローブは以下のスキームに従って合成した。

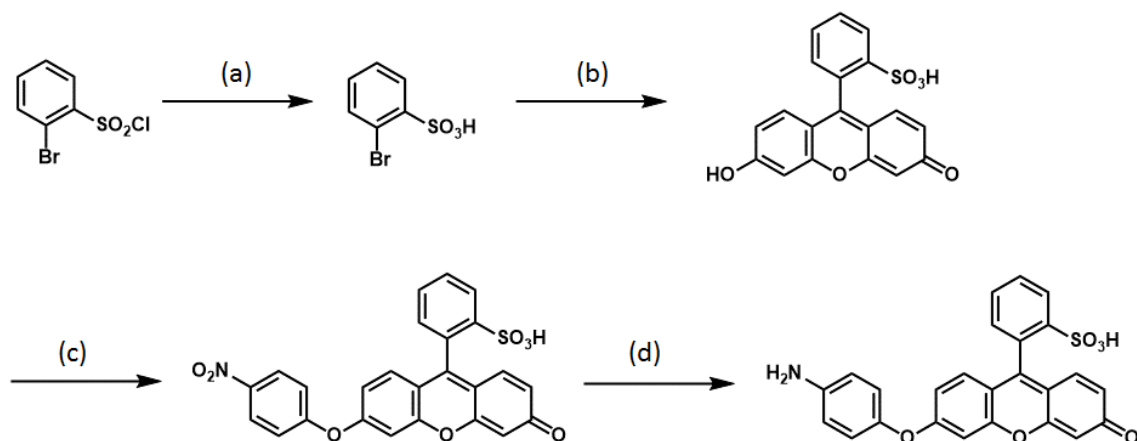


Scheme 2-2-1. Synthesis of a novel NADH detection fluorescent probe (SQC).

(a) MeSO_3H , 85 °C, Yield: quant. (b) NBS, MeCN/ H_2O , r.t., Yield: 76.7 % (c)

ClSO_3H , 0 °C \rightarrow 120 °C, Yield: 13.5 % (d) 1,4-Cyclohexadiene-1-propanoic acid,

HATU, DIEA, r.t., Yield: 6.1 %.



Scheme 2-2-2. Synthesis of a novel H_2O_2 detection fluorescent probe (APsF).

(a) Acetone/ H_2O , 50 °C, Yield: 49.8 % (b) i) *sec*-BuLi, THF, -78 °C ii) DiTBS

Xanthone, THF, -78 °C \rightarrow r.t. iii) 2 N HCl aq., r.t., Yield: 32.5 % (in 3 steps) (c) *p*-

fluoronitrobenzene, K_2CO_3 , MeCN/DMF, 180 °C, Yield: 49.1 % (d) Pd/C, H_2 ,

MeOH/ CH_2Cl_2 , r.t., Yield: 30.5 %.

NADH (H₂O₂) との反応前・反応後の蛍光色素について、その光学特性を取得した。

NADH 検出プローブ、H₂O₂ 検出プローブいずれも反応前の構造では消光し、反応後の構造で蛍光強度は大きく上昇しており、反応前後の蛍光強度は十分な S/N を有することが考えられた (Fig. 2-2-4, 2-2-5)。

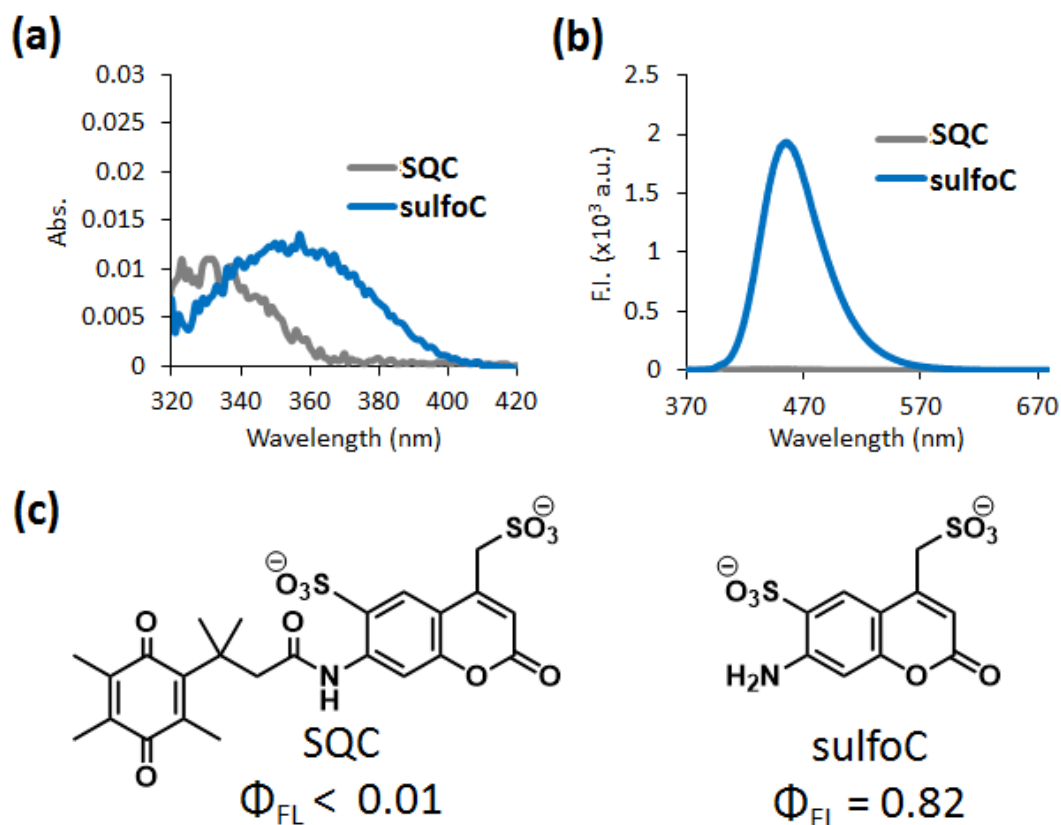


Fig. 2-2-4. (a) Absorbance and (b) emission spectra of 1 μ M probes (SQC or sulfoC) in PBS (pH 7.4) containing 0.1 % DMSO as a cosolvent. (c) Chemical structure and the fluorescence quantum yield of SQC or sulfoC. For determination of the fluorescence quantum yield, quinine sulfate in 0.1 N H₂SO₄ aq. ($\Phi_{FL} = 0.55$) was used as a fluorescence standard.

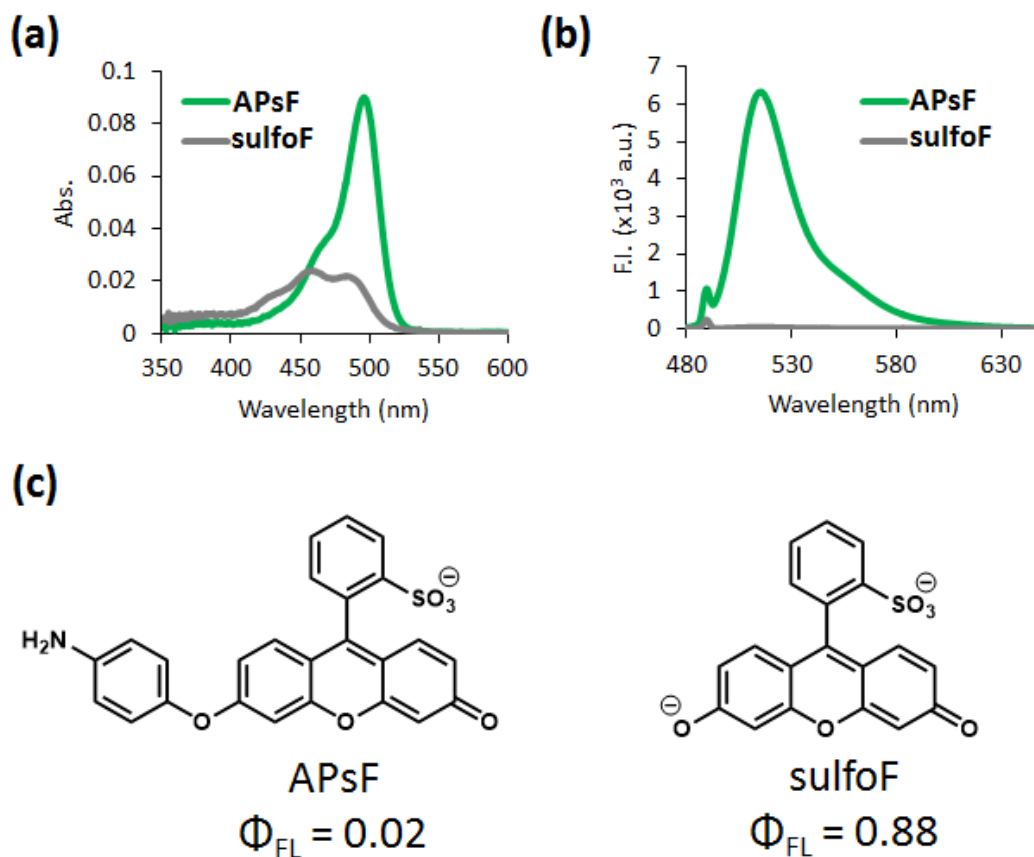


Fig. 2-2-5. (a) Absorbance and (b) emission spectra of 1 μ M probes (APsF or sulfoF) in PBS (pH 7.4) containing 0.1 % DMSO as a cosolvent. (c) Chemical structure and the fluorescence quantum yield of APsC or sulfoF. For determination of the fluorescence quantum yield, fluorescein in 0.1 N NaOH aq. ($\Phi_{FL} = 0.85$) was used as a fluorescence standard.

実際に開発したプローブが NADH および H₂O₂ を検出するかどうか検討したところ、いずれのプローブもサブマイクロオーダーの NADH (H₂O₂) を蛍光検出可能であることが分かった (Fig. 2-2-6)。特に蛍光プローブ SQC については NADH とほぼ量論的に反応していることが分かる。

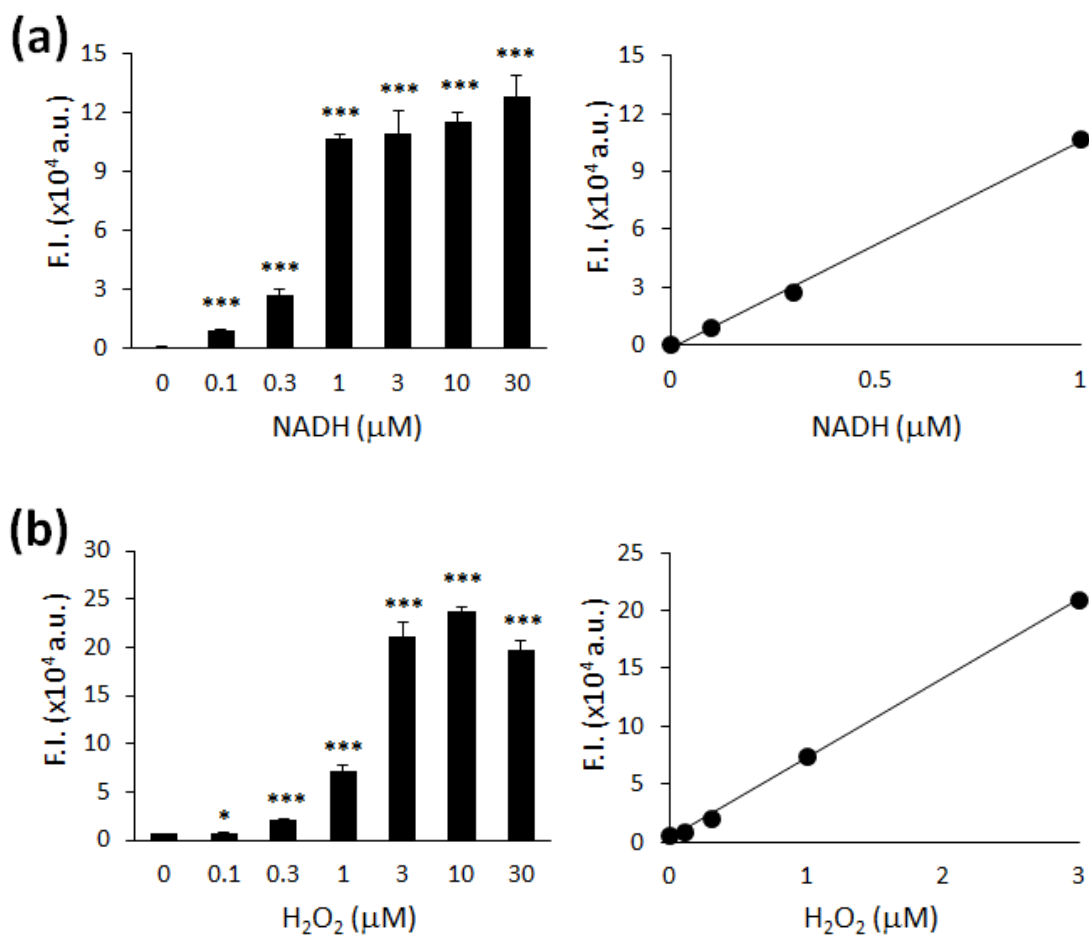


Fig. 2-2-6. Detection of NADH or H₂O₂ by using SQC or APsF.

(a) Probe solution: SQC (1 μM), NAD⁺ (100 μM), DT-diaphorase (1 U/mL) in DPBS. Ex./Em.=355/460 nm. Error bars represent S.D.. n=3, *** *p*<0.005

(b) APsF 10 μ M, HRP (1 U/mL) in DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline; pH 7.4). Ex./Em.=485/535 nm. Error bars represent S.D.. n=4, * $p<0.05$, *** $p<0.005$

続いて、開発したプローブを用いたカップルドアッセイによって生体内小分子を検出可能か検討した。L-lactate、glucose を対象にそれぞれと選択的に反応する酸化還元酵素である L-lactate dehydrogenase、glucose oxidase を用いて NADH および H_2O_2 を産生させ、これを開発したプローブにより検出したところ、数 μ M の代謝物を検出可能であることが確かめられた (Fig. 2-2-7)。検出感度が NADH、 H_2O_2 単体の時と比べて低下している原因は酸化還元酵素の反応性によるものと考えられる。

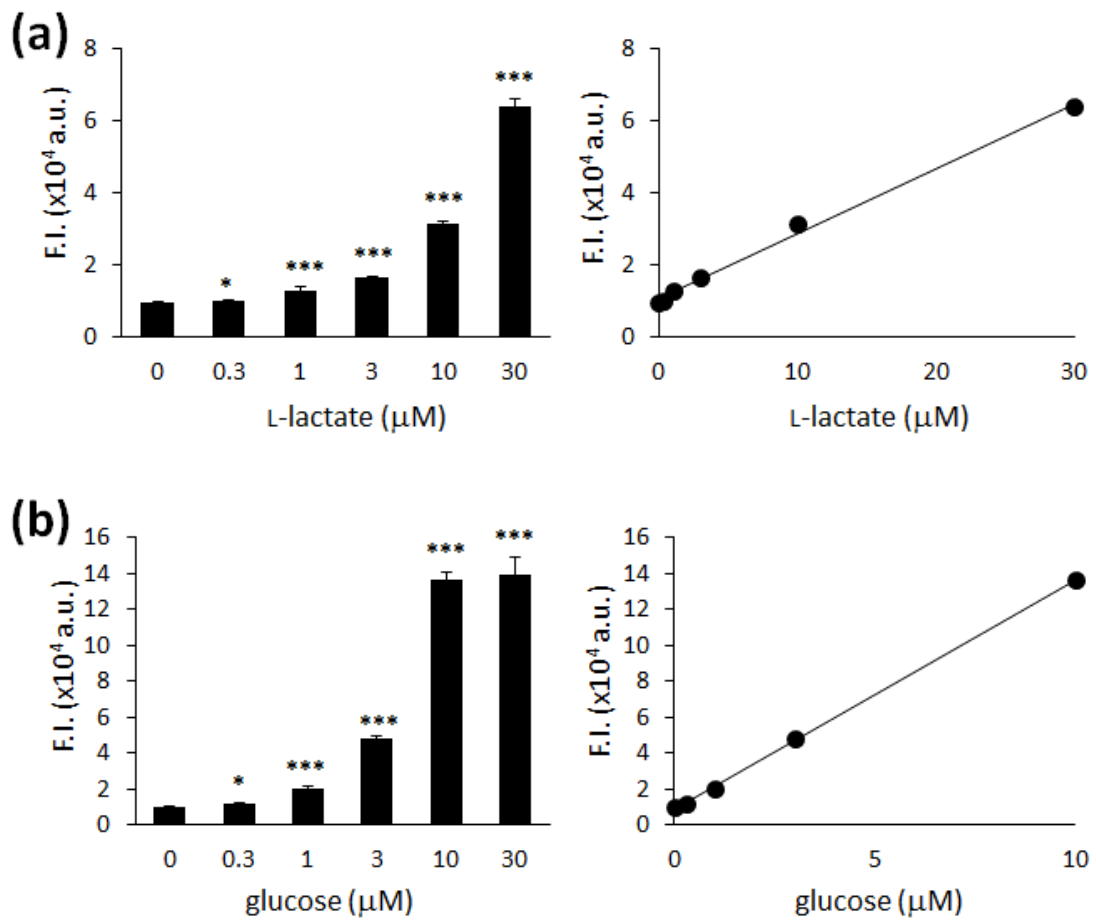


Fig. 2-2-7. Detection of L-lactate or glucose by using SQC or APsF.

(a) Probe solution: SQC (1 μM), NAD^+ (100 μM), DT-diaphorase (1 U/mL), LDH (1.5 U/mL) in DPBS (pH 7.4). Ex./Em.=355/460 nm. Error bars represent S.D..

$n=3$, * $p<0.05$,*** $p<0.005$

(b) APsF 10 μM , HRP (1 U/mL), FAD (5 μM), GOD (0.25 mg/mL) in DPBS (pH 7.4). Ex./Em.=485/535 nm. Error bars represent S.D.. $n=4$, * $p<0.05$ ***

$p<0.005$

最後に細胞共存下で細胞外に存在する代謝物を選択的に検出するかどうか検討した。細胞懸濁液に L-lactate、glucose をそれぞれ添加し、これとプローブ溶液を混合させたところ、蛍光上昇が見られた。さらにこの蛍光上昇は、これら生体内小分子を添加した条件において酸化還元酵素を含まないプローブ溶液を用いた場合には見られなかったことから、細胞外に添加した L-lactate (glucose) に由来する蛍光上昇と考えられる。従って、開発したプローブは細胞共存下においても検出対象の細胞外代謝物を選択的に検出することが可能であることが示された (Fig. 2-2-8)。

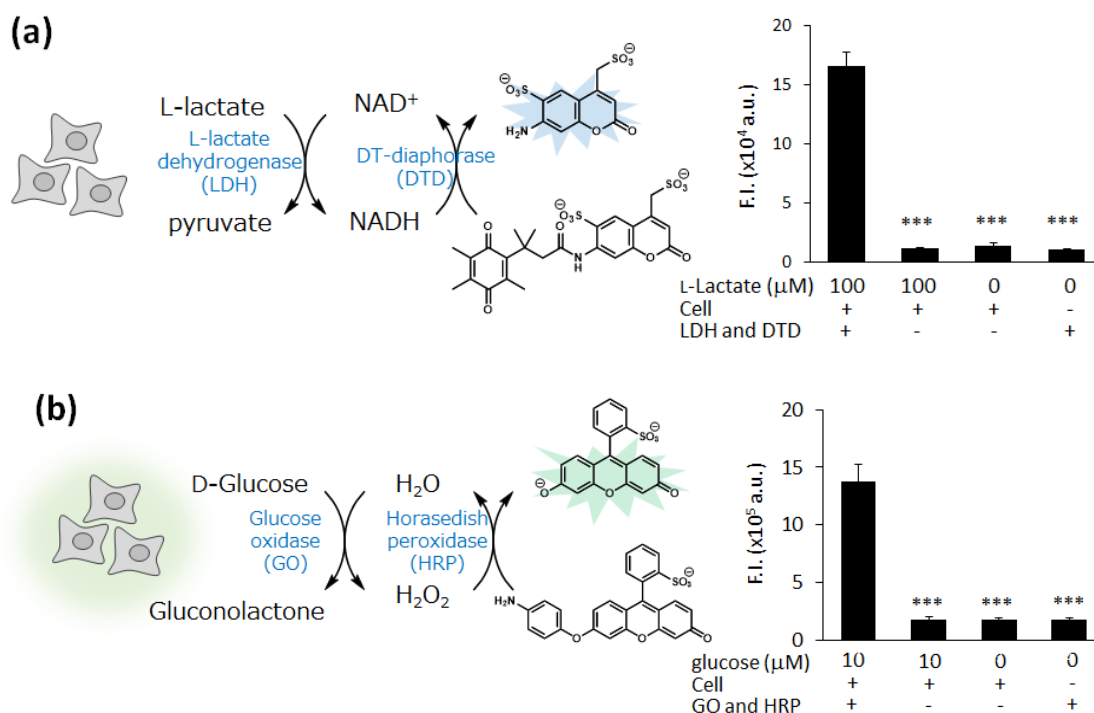


Fig. 2-2-8. Detection of extracellular L-lactate or glucose by using SQC or APsF.

(a) Probe solution: SQC ($2 \mu\text{M}$), NAD^+ ($200 \mu\text{M}$), DT-diaphorase (2 U/mL), LDH ($2 \mu\text{g/mL}$) in DPBS (pH 7.4). A549 cells (2×10^3 cells) were mixed with L-lactate solution and then probe solution was added to the mix solution. Ex./Em.=355/460 nm. Error bars represent S.D.. $n=8$. *** $P < 0.005$.

(b) APsF ($10 \mu\text{M}$), HRP (0.1 U/mL), FAD ($5 \mu\text{M}$), GOD (0.05 mg/mL) in DPBS (pH 7.4). A549 cells (2×10^3 cells) were mixed with glucose solution and then probe solution was added to the mix solution. Ex./Em.=485/535 nm. Error bars represent S.D.. $n=8$. *** $P < 0.005$.

・既存のカップルドアッセイに用いる蛍光プローブとの比較

既存のカップルドアッセイに用いる NADH 検出蛍光プローブ (resazurin) を用いて、上記 (Fig. 2-2-8.) と同様の実験を行い、選択的に細胞外代謝物を検出可能か検討し、開発した蛍光プローブとの比較を行った。

細胞外に検出対象の代謝物を添加した場合、蛍光プローブ溶液を加えることで蛍光上昇が確認されたが、代謝物と反応して NADH を産生させる酵素を含まないプローブ溶液を用いても蛍光上昇が観察され、目的の細胞外代謝物の有無に関わらず細胞と共存することにより蛍光上昇する様子が確認されたことから、細胞外代謝物に由来しない蛍光シグナルが生成していることが分かる。これは resazurin が細胞内へ透過し、酸化還元反応を起こして resorufin が生成することで、蛍光上昇が見られたと考えられる。一方、開発した蛍光プローブ SQC の場合、そのような蛍光上昇は確認されず、細胞存在下で細胞外代謝物を選択的に検出する蛍光プローブとして適切だと考えられる (Fig. 2-2-9)。

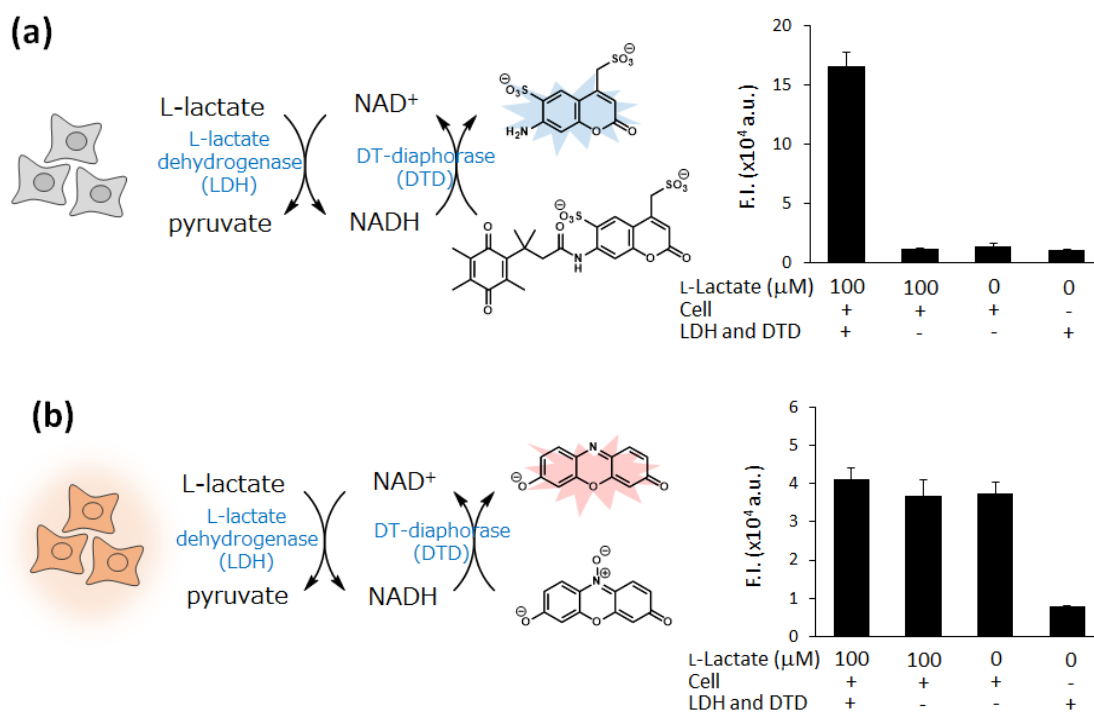


Fig. 2-2-9. Detection of extracellular L-lactate by using SQC or resazurin.

A549 cells (2×10^3 cells) were mixed with L-lactate solution and then the probe solution was added to the mix solution.

(a) Probe solution: SQC ($2 \mu\text{M}$), NAD^+ ($200 \mu\text{M}$), DT-diaphorase (2 U/mL), LDH ($2 \mu\text{g/mL}$) in DPBS (pH 7.4). Ex./Em.=355/460 nm. Error bars represent S.D.. $n=8$.

(b) Probe solution: Resazurin ($50 \mu\text{M}$), NAD^+ ($200 \mu\text{M}$), DT-diaphorase (2 U/mL), LDH ($2 \mu\text{g/mL}$) in DPBS (pH 7.4). Ex./Em.=544/590 nm. Error bars represent S.D.. $n=8$.

第三節 小括

細胞外代謝物を細胞共存下においても選択的に蛍光検出可能な新規 NADH 検出蛍光プローブ SQC および H_2O_2 検出蛍光プローブ APsF を開発した。これら開発した蛍光プローブはサブマイクロオーダーの NADH、 H_2O_2 と反応して十分な蛍光上昇を示すことから、細胞外の微量の代謝物を検出可能であることが考えられる。

第三章 Methylglyoxal (MG) 代謝系阻害剤の探索

第三章 Methylglyoxal (MG) 代謝系阻害剤の探索

第一節 がんと Methylglyoxal (MG) 代謝系

第二章までの検討で細胞共存下においても目的の細胞外代謝物を検出することが可能な蛍光プローブの開発に成功したことを報告した。続いて POS 法という概念に基づき、実際に開発した蛍光プローブを用いて生細胞の代謝活性を評価し、その阻害剤を探索することとした。第一章では、生体内小分子を代謝する酵素の多くはがんの創薬標的とされていること、そして重要とされながらもその薬剤の開発が進行していない酵素が存在することを述べたが、その代表的な例が Methylglyoxal (MG) 代謝系である。

MG は、解糖系中間代謝物である glyceraldehyde-3-phosphate および dihydroxy acetonephosphate (DHAP) が産生されると同時に生成されるジカルボニル構造の小分子であり、MG はタンパクや核酸、リン脂質と反応する。MG はタンパクとは主にアルギニン残基と反応して imidazolone 構造を形成し、DNA とは主にデオキシグアノシンと反応して imidazopurione 構造を形成する (Fig. 3-1-2)。これらが形成することで正常な細胞機能が阻害されるため、高濃度の MG の細胞内蓄積は細胞増殖抑制や細胞死を引き起こすことが知られている。このように細胞内で MG は様々な付加体を形成するが、特に glutathione (GSH) が付加したヘミアセタール体が最も多く形成され、酵素 GLO1 はこれを基質として S-D-lactoylglutathione (SLG) を産生する。酵素 GLO2 は SLG を基質として D-lactate と GSH を産生する (Fig. 3-1-1)。

このように、MG 代謝系は酵素 GLO1 (glyoxalase1) と GLO2 (glyoxalase2) による二段階の反応を経て、有害な MG を無害な D-lactate へと変換する役割を担っている¹⁴⁻¹⁶。

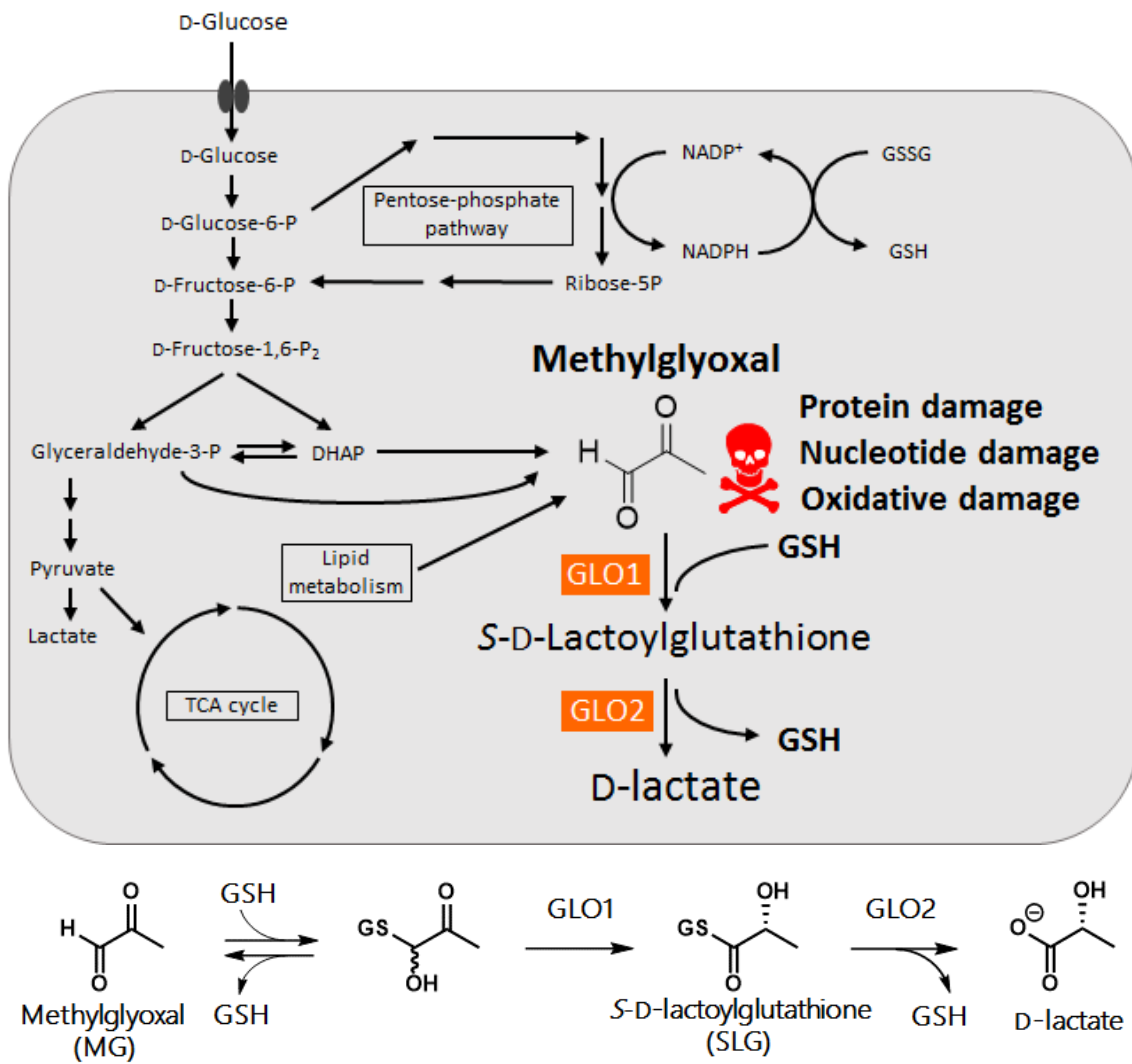


Fig. 3-1-1. Methylglyoxal metabolic pathway.

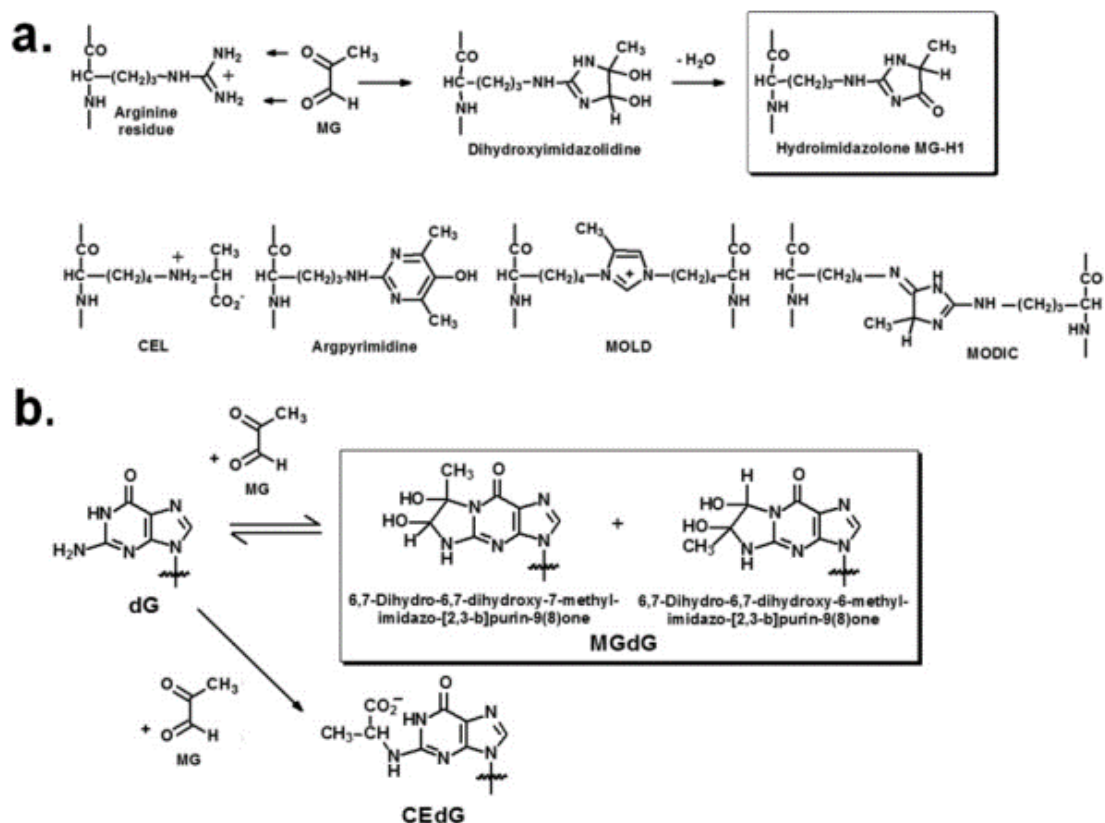


Fig.3-1-2. Biochemistry of dicarbonyl glycation-glycation by methylglyoxal¹⁶.

(a) Formation of MG-H1 residues in proteins. Other minor adducts of MG are: CEL, argpyrimidine, bis(lysyl)-4-methylimidazolium cross-link MOLD and arginine/lysine cross-link MODIC (MG-derived imidazolium cross-linking).

(b) DNA adducts. Adduct residues of deoxyguanosine are shown with guanyl base.

多くのがんでは解糖系が亢進しており、これに比して MG の産生も増加するが、がんでは MG を無害な D-lactate へ代謝する MG 代謝系が亢進しており、これが MG の毒性に対する防御に寄与している。従って MG 代謝系を阻害し、MG の細胞内蓄積を促進することでがん細胞選択的な細胞死を導くことが可能であることが知られている¹⁴⁻¹⁶。

実際に、下記に示すように多くのがんで MG 代謝系が亢進しており、これを阻害することによる治療可能性が報告されている (Table 3-1-1)¹⁷⁻²¹。また、抗がん剤耐性の高いがんにおいて MG 代謝系酵素 GLO1 の発現が高いことが明らかにされており、例えばエトポシドのようなアポトーシスを誘導する抗がん剤に耐性をもつヒト白血病細胞 UK711 は GLO1 阻害によりエトポシド感受性が高まることが報告されている²²。

さらにこの MG 代謝系が創薬標的として重要な点としては、肺小細胞がんや Triple negative 乳がん、膵臓がんなどの難治性のがんにおいても MG 代謝系は亢進しており^{21,23-25}、肺小細胞がんについてはその阻害による治療可能性が報告されていることである。

Table 3-1-1. Methylglyoxal metabolic pathway is a biomarker and therapeutic target of many tumors.

Cancer	Upregulation	Cell growth	Reference
Gastric cancer	GLO1 gene	Inhibition by BBGCD (<i>in cellulo</i>)	<i>Oncogene</i> , 2015 , 34, 1196-1206.
Breast cancer	GLO1 mRNA and protein	Inhibition by siRNA (<i>in cellulo</i>)	<i>Int. J. Clin. Exp. Pathol.</i> , 2017 , 10, 10852-10862.
Prostate cancer	GLO1 activity	Inhibition by BBGCD (<i>in cellulo</i> and <i>in vivo</i>)	<i>Clin. Cancer Res.</i> , 2001 , 7, 2513-2518.
Melanoma	GLO1 mRNA	Inhibition by siRNA (<i>in cellulo</i>)	<i>Melanoma Res.</i> , 2010 , 20, 85-96.
Hepatocellular carcinoma	GLO1 mRNA	Inhibition by shRNA (<i>in cellulo</i> and <i>in vivo</i>)	<i>Int. J. Clin. Exp. Pathol.</i> , 2014 , 7, 2079-2090.
Lung cancer (NSCLC, SCLC)	GLO1 activity	Inhibition by BBGCD (<i>in cellulo</i> and <i>in vivo</i>)	<i>Clin. Cancer Res.</i> , 2001 , 7, 2513-2518.
Leukemic stem cells (Bcr-Abl ⁺)	GLO1 activity	Inhibition by BBGCD (<i>in cellulo</i>)	<i>Cell Death Differ.</i> , 2010 , 17, 1211-1220.
Breast cancer (Triple negative)	GLO1 activity	Not Determined	<i>Oncotarget</i> , 2012 , 5, 5472-5482.
Pancreatic cancer	GLO1 protein	Not Determined	<i>Anticancer Res.</i> , 2012 , 32, 3219-3222.
Leukimia (apoptosis-resistant UK711 and UK110 cells)	GLO1 mRNA	enhanced etoposide-induced apoptosis by cotreatment with BBGCD (<i>in cellulo</i>)	<i>Blood</i> , 2000 , 95, 3214-3218.

このように様々ながんにおいて MG 代謝系は亢進しており、特に難治性の肺小細胞がんに対してその阻害による治療可能性が報告されていることを鑑みると、MG 代謝系を阻害する薬剤の開発はがん治療の有用な戦略となることが期待される。

しかしながら、現状として MG 代謝系を阻害する薬剤の開発は進行していない。現在、最も代表的な MG 代謝系阻害剤として GSH 類縁体の BBG (*S-p*-bromobenzylglutathione) が存在する。BBG は酵素 GLO1 を阻害し、その K_i は 100 nM 程であるが、細胞膜透過性が低く、生細胞系で利用するためにエステル化を施した誘導体が BBGCD である。BBGCD が生細胞系でその阻害効果を示すには 10 μ M 以上必要であり、臨床応用までは行われず、生化学実験での使用に留まっている¹⁶。

さらに、既存の阻害剤 BBGCD とは異なる母核に基づく新規阻害剤の開発が必要とされる理由の1つとして、肺がん細胞の培養細胞系では BBGCD が増殖抑制効果を示すには正常肺細胞よりも高濃度必要であることが本研究の検討で明らかになっている。

具体的には、各種肺がん細胞 (A549, H522, H226, DMS114, DMS273)、肺正常細胞 (NHBE) に対して BBGCD を添加して 48 時間培養後 CCK8 アッセイを行うことで BBGCD による細胞増殖抑制効果を調べたところ、正常細胞 NHBE に対して最も低濃度で増殖抑制を示し、がん細胞 A549 では増殖抑制効果を示すまでに数十 μ M の BBGCD が必要であった (Table 3-1-2)。

Table 3-1-2. IC₅₀ of BBGCD toward cell growth. Cells were incubated with BBGCD (0-50 μM) in culture medium for 48 hr at 37 °C and cell viability was evaluated by CCK-8 assay.

	Normal		Tumor			
	NHBE	A549	H522	H226	DMS114	DMS273
IC ₅₀ (μM)	2.7	29.6	9.8	4.7	6.3	10.8

この原因として、細胞内の阻害剤濃度が正常細胞とがん細胞で大きく異なることが判明した。BBGCD は細胞内でエステル構造が加水分解され、BBGC および BBG が生成する (Fig. 3-1-2)。

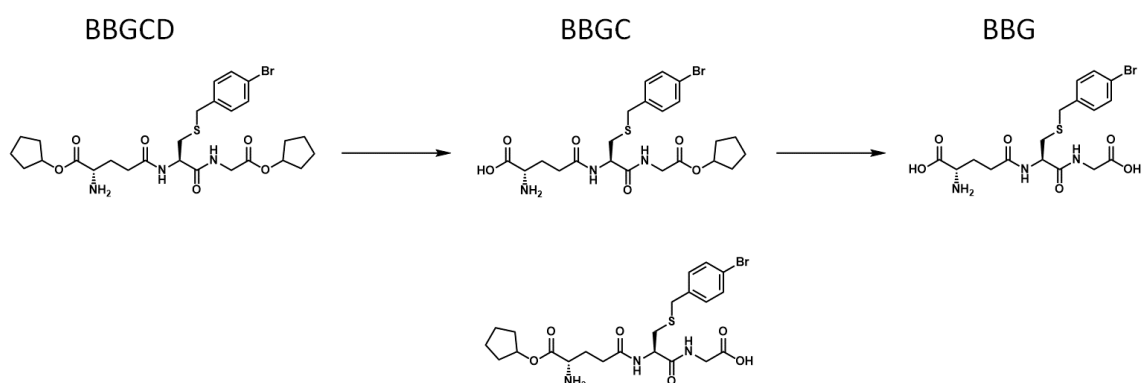


Fig. 3-1-2. BBGCD is hydrolyzed to BBGC or BBG.

正常細胞内の BBG を基準にした時の各細胞種における BBGCD、BBGC、BBG の細胞内濃度を以下のグラフに示す。これら BBGCD、BBGC、BBG の細胞内濃度はいずれもがん細胞よりも正常細胞において特に高く、BBGCD が正常細胞に対してより低濃度で細胞増殖抑制効果を示した理由と考えられる (Fig. 3-1-3)。

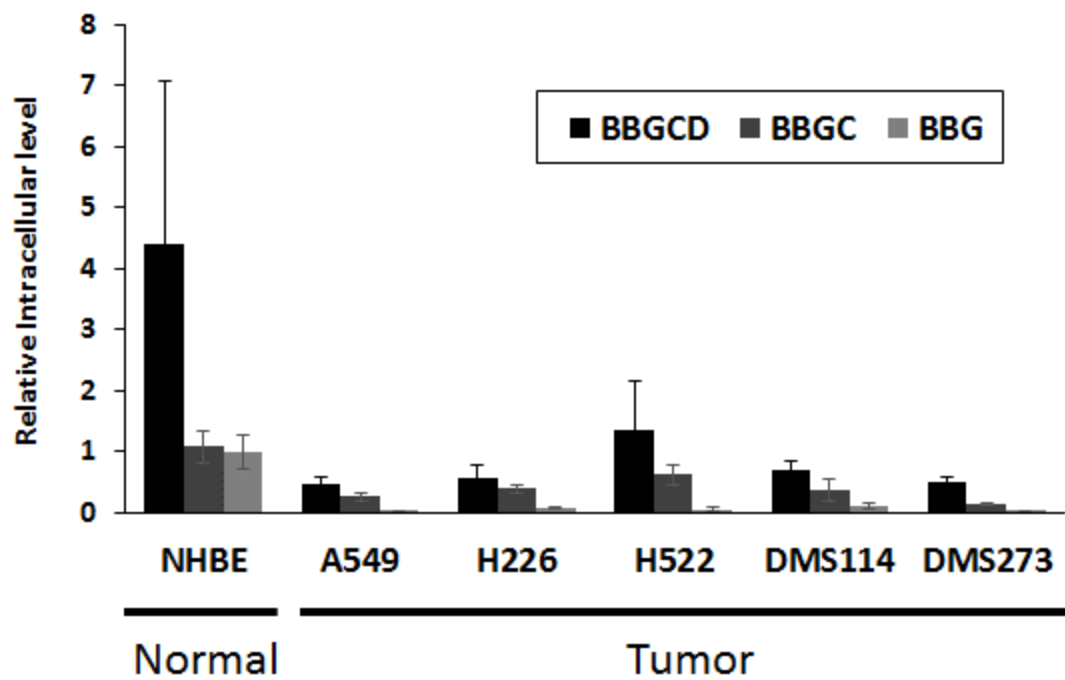


Fig. 3-1-3. Intracellular level of BBG, BBGC or BBGCD. Cells were incubated with BBGCD (10 μ M) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at 37 $^{\circ}$ C. Cells were lysed and the lysate samples were measured by LC-MS/MS. Error bars represent S.D.. n=4.

以下に細胞内の阻害剤濃度および増殖抑制効果の IC₅₀ を表にまとめた。NHBE の細胞内 BBG 濃度を 1 として各細胞種における BBGCD、BBGC、BBG の細胞内濃度を算出した。低濃度で増殖抑制効果が見られた細胞種ほど細胞内の阻害剤濃度が高い傾向にある (Table 3-1-3)。

Table 3-1-3. IC₅₀ of BBGCD toward cell growth and intracellular level of BBG, BBGC or BBGCD.

	Relative intracellular level			IC ₅₀ (μM)
	BBGCD	BBGC	BBG	
NHBE	4.41	1.08	1	2.7
A549	0.48	0.27	0.027	29.6
H522	0.57	0.39	0.074	9.8
H226	1.36	0.62	0.062	4.7
DMS114	0.69	0.38	0.12	6.3
DMS273	0.50	0.15	0.026	10.8

このように、既知の阻害剤として抗がん作用を示すことが知られる BBGCD であるが、肺がんの培養細胞での検討では正常細胞より低濃度で増殖抑制阻害を示す結果であった。従って、新規母核に基づく MG 代謝系阻害剤を開発することが望ましいが、既存の MG 代謝系の活性評価法としては精製酵素を用いた *in vitro* での評価法であり、現在までに MG 代謝系の活性を生細胞系で評価する high throughput screening 系は開発されていない (Table 3-1-4)¹⁶。

Table 3-1-4. Methods for measurement of glyoxalase metabolic activities. (*Clin. Sci.*, **2016**, *130*, 1677-1696.より改変)

	Detection of metabolite	Method	Throughput	Assay
Glyoxalase 1 activity	S-D-lactoylglutathione	Spectrophotometric assay at 240 nm	High	<i>In vitro</i>
Glyoxalase 2 activity	S-D-lactoylglutathione	LC-MS	Low	<i>In vitro</i>
		Spectrophotometric assay at 240 nm	High	<i>In vitro</i>
	GSH	LC-MS	Low	<i>In vitro</i>
		D-lactate	LC-MS	Low

そこで、本研究では Pathway-Oriented Screening 法によって新規 MG 代謝系阻害剤を探
索することを目指した。

第二節 Methylglyoxal (MG) 代謝系阻害剤の探索

MG 代謝系の亢進が知られるがんの中でも、肺小細胞がんにおける MG 代謝系の活性を評価し、その阻害剤を取得することとした。MG 代謝系の酵素 GLO1 の活性は特に肺がんで亢進しており (Fig. 3-2-1)²¹、難治性の肺小細胞がんに対して MG 代謝系を阻害することによる治療可能性が報告されている。

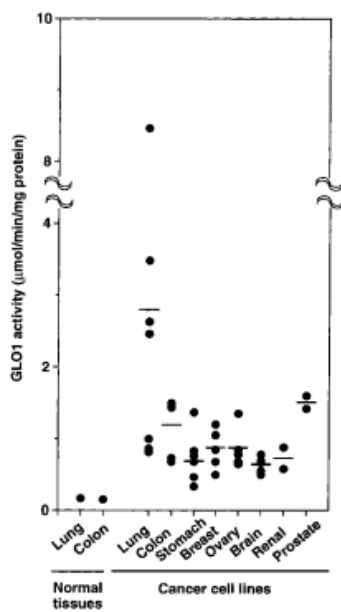


Fig. 3-2-1. Glyoxalase1 enzyme activity in 38 human solid tumor cell lines and human normal lung tissue samples²¹.

肺小細胞がんは高い浸潤性、致死性を持ち、転移範囲の高いがんで 5 年生存率は 7% と非常に予後は悪いことが知られており、難治性で治療に関してここ 30 年大きな発展はなく、有用な抗がん剤がないことから“recalcitrant cancer (手に負えないがん)”と呼ばれている²⁶。従って、このような治療が困難とされているがんに対して MG 代謝系の阻害剤を開発することは新たな治療戦略として期待される。

本研究では、肺小細胞がん細胞 DMS114 を用いて、MG を input、D-lactate を output と
 してこの MG 代謝系を評価することとし、output である細胞外の D-lactate は下図のよう
 に D-lactate dehydrogenase (DLDH) を用いて pyruvate に変換し、その際產生される
 NADH を開発した蛍光プローブにより検出する (Fig. 3-2-2)。

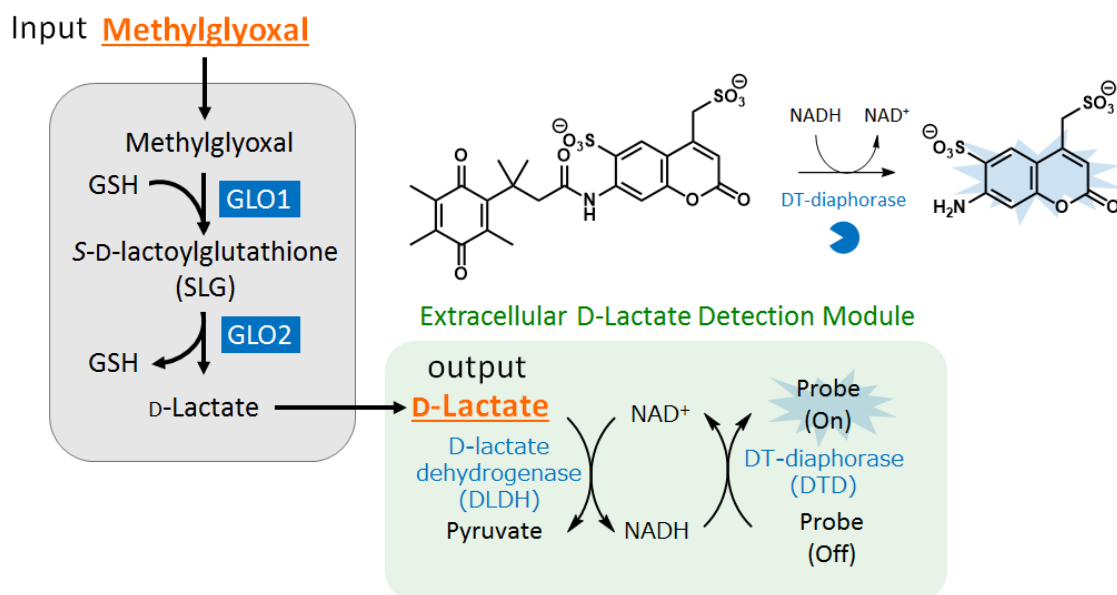


Fig. 3-2-2. POS for identification of compounds to inhibit MG metabolic pathway.

・開発した蛍光プローブ SQC による MG 代謝系の評価

input である MG を細胞に添加後、代謝されて細胞外に放出される D-lactate を選択的に検出することが可能か検討した。

各条件で DMS114 細胞をインキュベーション後、蛍光プローブ溶液を加え、プレートリーダーにて蛍光強度を測定した。

基質 MG が存在しない条件でインキュベーションした場合、蛍光上昇は見られない一方で、基質 MG が存在する場合では蛍光上昇が観察された。またこの蛍光上昇は既知の MG 代謝系阻害剤である BBGCD を基質とともにインキュベーションした条件において抑えられることが確認された。さらに、基質 MG を添加してインキュベーションした場合でも蛍光プローブ溶液に D-lactate を pyruvate に変換してその際 NADH を産生する D-lactate dehydrogenase が存在しなければ蛍光上昇は見られなかった (Fig. 3-2-3)。

これらの結果から、MG 添加後、MG 代謝系で代謝され細胞外へ放出された D-lactate を選択的に蛍光検出することが可能であること、そして MG 代謝系の阻害を蛍光強度の減少という形で評価可能であることが確かめられた。つまり、生細胞系で MG 代謝系の活性を開発した蛍光プローブにより評価可能であることが示された。

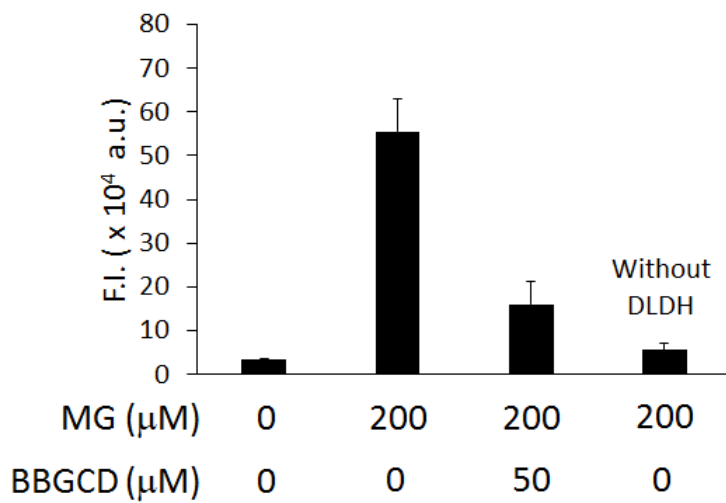


Fig. 3-2-3. Detection of extracellular D-lactate released from DMS114 cells.

DMS114 cells (2×10^3 cells) were incubated with MG (0 or 200 μM), BBGCD (0 or 50 μM) in DPBS (pH 7.4) for 1 hr at 37 °C. After incubation, probe solution was added and the fluorescence intensity was measured by plate reader (Ex./Em.= 355/460 nm). Probe solution: probe (2 μM), NAD^+ (200 μM), DT-diaphorase (2 U/mL), D-lactate dehydrogenase (0 or 2 U/mL) in DPBS (pH 7.4). Error bars represent S.D.. n=4.

・阻害剤スクリーニングの実施

スクリーニングを実施するにあたり、構築したアッセイ系が十分なアッセイ精度を有しているか検討した。一般にスクリーニング系のアッセイ精度は

$Z' = 1 - \{(3 * SD_1 + 3 * SD_2) / (Average_1 - Average_2)\}$ で算出され (Average₁、SD₁ は

negative control、Average₂、SD₂ は positive control)、0.5 以上が望ましいとされる。

MG を添加する群を negative control、添加しない群を positive control として Z' を算出

すると 0.69 となり、十分なアッセイ精度を有していることが示された (Fig. 3-2-4)。

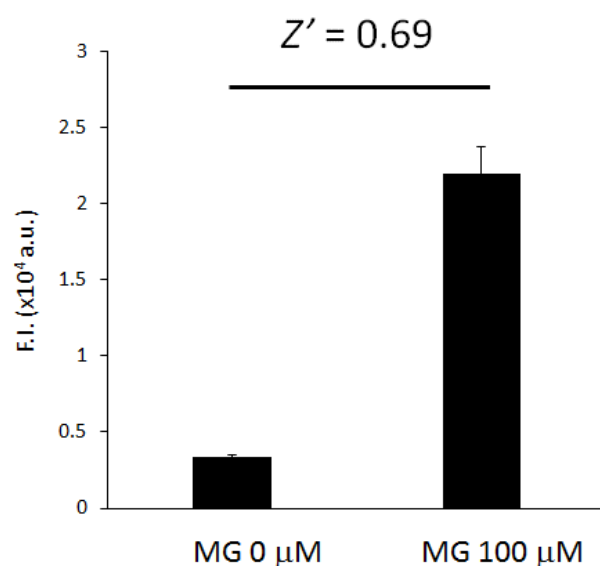


Fig. 3-2-4. Detection of extracellular D-lactate released from DMS114 cells.

DMS114 cells (2×10^3 cells) were incubated with MG (0 or 100 μM) in DPBS (pH 7.4) for 2hr at r.t.. After incubation, probe solution was added and the

fluorescence intensity was measured by plate reader (Ex./Em.= 355/460 nm).

Probe solution: SQC (2 μM), NAD⁺ (200 μM), DT-diaphorase (2 U/mL), D-lactate dehydrogenase (2 U/mL) in DPBS (pH 7.4). Error bars represent S.D.. n=16

(treatment with MG 0 μM), n=336 (treatment with MG 100 μM).

開発したアッセイ系が十分なアッセイ精度を有していることが分かったため、これを用いて生細胞系で MG 代謝系の活性を阻害する化合物を東京大学創薬機構提供の 9600 化合物から探索することとした。

スクリーニングの流れ

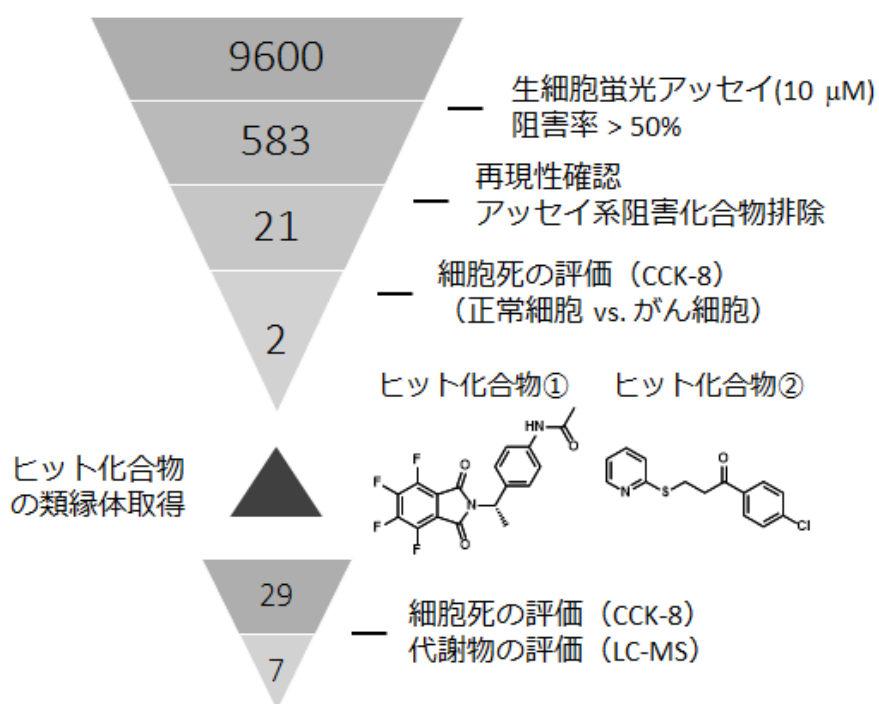


Fig. 3-2-5. Flow chart for screening of the small-molecule compounds library.

・1次スクリーニング

がん細胞 DMS114 を基質 MG および各種化合物とともに 384 wellplate 中でインキュベーション後、プローブ溶液を添加し、蛍光強度を測定した。蛍光強度の減少を化合物による MG 代謝系に対する阻害とした。MG を添加しない群を positive control として阻害率 100 %、MG を添加した群を negative control として阻害率 0 %と定め、各化合物の阻害率を算出した (Fig. 3-2-6)。阻害率 50 %を超える化合物を 2 次スクリーニングに進めた。

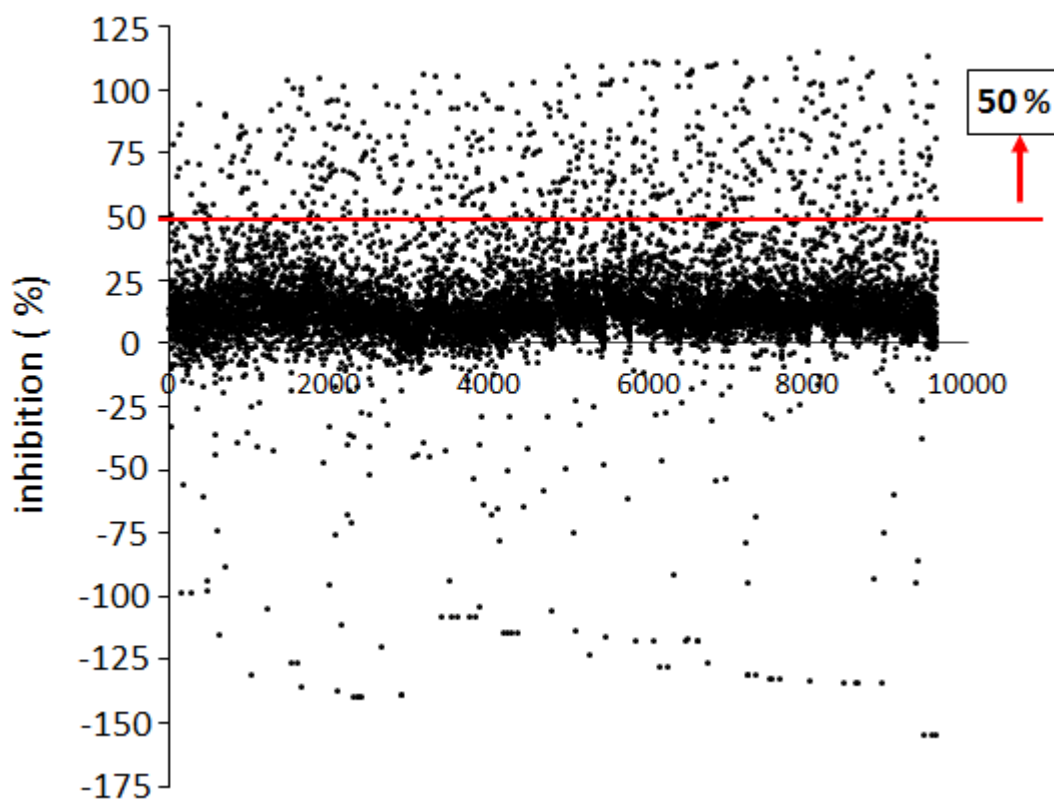


Fig. 3-2-6. The result of 1st screening. DMS114 cells (2×10^3 cells) were incubated with MG (0 or 100 μM) and compounds (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at r.t. After incubation, probe solution was added and the fluorescence intensity (Ex./Em.= 380/490 nm) was measured at 30 min after probe solution was added. Probe solution: SQC (2 μM), NAD^+ (200 μM), DT-diaphorase (2 U/mL), D-lactate dehydrogenase (2 U/mL) in DPBS (pH 7.4).

・2次スクリーニング

2次スクリーニングでは、1次スクリーニングの再現性確認および、細胞のMG代謝系ではなく検出系の阻害を示すような false positive を除く作業を行った。Fig.3-2-7 左に示すように、再現よく化合物は阻害を示していた。細胞非存在下の条件では、MG、D-lactate、化合物の混合溶液にプローブ溶液を添加することで、D-lactate を検出する過程を阻害しているか否か検討した。false positive を除くために、1次スクリーニングと同様に細胞共存下で阻害率を算出した場合と、細胞非存在下で阻害率を算出した場合を比較し (Fig. 3-2-7 右)、細胞非存在下の条件よりも細胞存在下の条件でより大きな阻害率を示した化合物をヒットとして3次スクリーニングへ進めた ((細胞存在下における阻害率) > 30 %かつ (細胞存在下における阻害率) > (細胞非存在下における阻害率))。

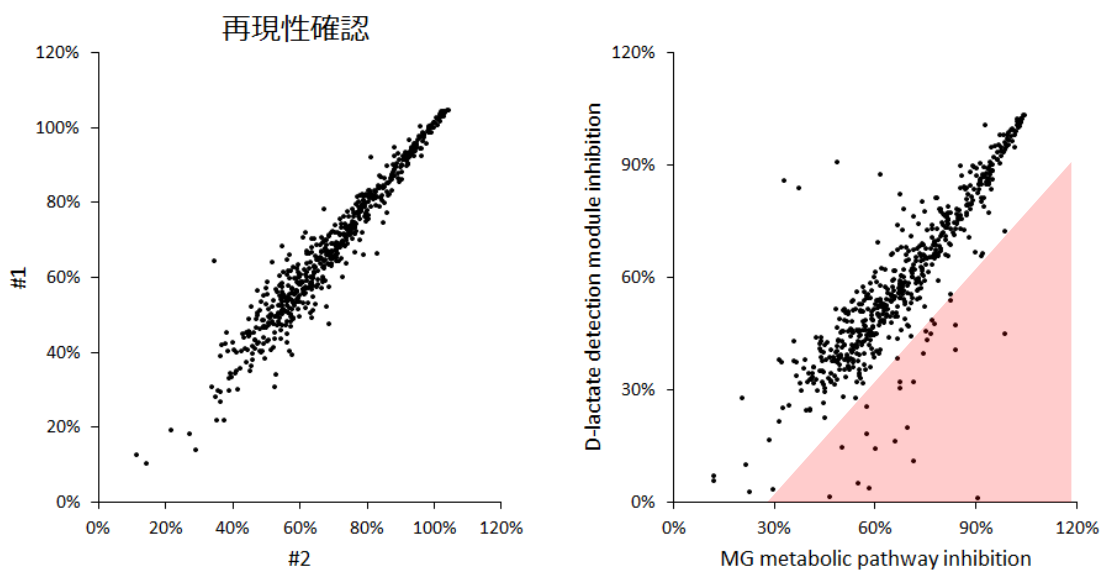


Fig. 3-2-7. The result of 2nd screening.

“Presence of cells” conditions: DMS114 cells (2×10^3 cells) were incubated with MG (0 or 100 μM) and compounds (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at r.t..

“Absence of cells” conditions: MG (0 or 100 μM), D-lactate (0 or 5 μM) and compounds (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) were incubated for 2hr at r.t..

After incubation, probe solution was added and the fluorescence intensity (Ex./Em.= 380/490 nm) was measured at 30 min after probe solution was added.

Probe solution: SQC (2 μM), NAD^+ (200 μM), DT-diaphorase (2 U/mL), D-lactate dehydrogenase (2 U/mL) in DPBS (pH 7.4).

・3次スクリーニング

2次スクリーニングで得られた化合物が増殖抑制効果を示すか検討した。がん細胞 (DMS114) と正常細胞 (NHBE) を用いて比較することとし、通常培地にて化合物存在下 48 時間培養した後 CCK-8 アッセイで評価した (Table 3-2-1.)。がん細胞でより強い増殖抑制効果を示す化合物をヒット化合物として、以下の2種類の化合物を得た (Fig. 3-2-8)。

Table 3-2-1. The result of 3rd screening. DMS114 (NHBE) cells were seeded at 5 x 10³ cells to 96 well plate. After incubation for 12hr at 37 °C, compounds (0, 0.3, 1, 10 μM) were added to cells. After incubation for 48 hr in culture medium at 37 °C, CCK8 assay was performed.

	Cell growth inhibition (%)					
	NHBE			DMS114		
	0.3 μM	1 μM	10 μM	0.3 μM	1 μM	10 μM
1	15.1	9.4	2.2	-5.9	-10.7	-8.1
2	-22.9	15.1	30.5	8.2	-10.8	3.4
3	-23.9	6.9	20.8	-1.5	-7	-10.8
4	-11	8.3	11.2	5.1	3.2	34.4
5	-20.7	5.8	4	-0.8	-5.7	-16.4
6	-29.3	11.5	73.5	1.3	5.1	6.3
7	-21.1	4.4	32.7	15.7	21.1	25.7
8	-24.3	10.8	-4.2	-9.9	-23.8	9.3
9	2.2	6.9	-23.2	6.8	-6.3	3.6
10	-17.8	2.2	-22.5	-3	-10.3	6.9
11	-26.4	-7.1	-7.1	-6.6	-5.7	-7.7
12	-20	-17.8	24.8	-2.8	-9	-6.2
13	-31.4	1.9	68.1	3.7	11.2	18.7
14	-17.8	0.4	83.5	12.7	16.2	39.2
15	-18.6	-2.1	59.5	-11.6	-15.1	86.5
16	0.4	-5.3	3.3	-0.3	-8	-15.1
17	-15.3	14.8	-1	-2.6	-7.5	-1.8
18	-23.6	-1.7	13	-0.5	2.9	25.3
19	-18.9	4.7	0.8	4.5	4	6.8
20	-10	6.5	25.1	12.2	24.9	21
21	-17.8	28.7	58.1	33.5	93.1	96.1

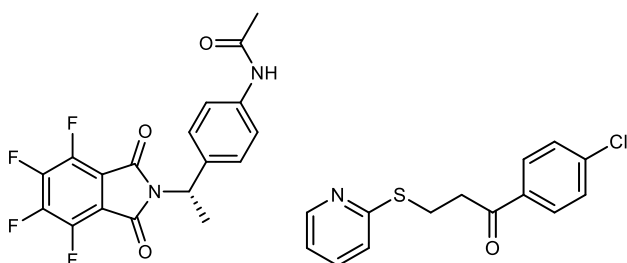


Fig. 3-2-8. The chemical structures of hit compounds.

・類縁体を用いた4次スクリーニング

3次スクリーニングで得られた2種類の化合物について、それぞれの類縁体(計29種)

を創薬機構から提供して頂き、MG代謝系阻害能と増殖抑制効果を検討した。

増殖抑制効果は、正常細胞1種(NHBE)とがん細胞2種(DMS114, DMS273)で比較

することとし、通常培地にて化合物存在下48時間培養した後CCK-8アッセイで評価し

た。MG代謝系阻害能は、基質MGを細胞に添加後、最終産物として細胞外に放出される

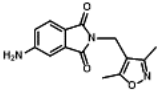
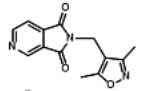
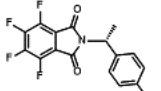
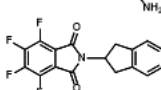
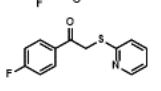
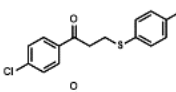
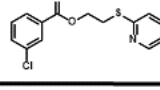
D-lactateをLC-MSにて測定することで検討した(Table 3-2-2)。

Table 3-2-2. The result of 4th screening. Cell Viability assay: DMS114, DMS273 or NHBE cells were seeded at 5 x 10³ cells to 96 well plate. After incubation for 12hr at 37 °C, compounds (0, 0.05, 0.5, 5 μM) were added to cells. After incubation for 48 hr in culture medium at 37 °C, cell viability was evaluated by CCK8 assay. Measurement of extracellular D-lactate: DMS114 or DMS273 (2 x10⁵ cells) were incubated with MG (100 μM) and compounds (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) for 3hr at 37 °C. After incubation, the supernatants were measured by LC-MS.

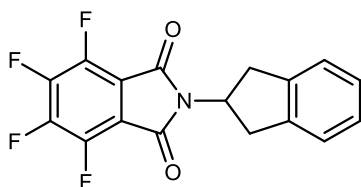
	D-lactate inhibition (%)			Cell growth inhibition (%)								
	DMS114		DMS273	DMS114			DMS273			NHBE		
	10 μM	10 μM	0.05 μM	0.5 μM	5 μM	0.05 μM	0.5 μM	5 μM	0.05 μM	0.5 μM	5 μM	
1	-67.7	-28.9	6.2	-0.5	29.7	16.0	21.0	62.9	4.5	6.6	87.1	
2	73.5	83.6	8.3	6.1	10.0	14.9	21.9	24.8	6.9	-2.5	32.7	
3	64.7	83.0	-1.4	3.0	6.5	1.9	29.9	5.9	-15.7	-2.8	49.1	
4	29.1	40.5	-5.2	7.4	5.1	-8.2	25.2	31.8	-12.6	-6.7	-8.1	
5	12.7	57.5	-3.9	-3.2	5.6	-9.3	16.6	20.6	-7.4	-5.6	-4.2	
6	-59.5	7.0	-7.8	-2.9	-2.1	-11.6	12.4	20.6	-8.1	-34.2	84.7	
7	11.4	28.9	-11.0	1.4	6.3	0.2	-2.6	28.8	-6.3	-17.8	84.0	
8	-38.6	40.0	7.1	15.8	16.0	0.2	21.9	33.5	-15.0	-27.6	9.7	
9	26.6	40.8	21.6	-3.6	13.6	26.7	25.5	68.2	-1.1	-8.1	-2.8	
10	-4.0	28.6	3.3	12.9	15.0	26.7	32.0	43.8	-0.8	14.9	1.3	
11	-7.2	14.2	0.8	2.4	-0.1	9.2	34.3	25.0	-13.7	6.2	-7.0	
12	20.0	-4.2	6.1	-5.5	-4.5	6.1	29.9	17.0	1.7	4.5	-1.1	
13	31.6	57.7	-3.8	-8.2	16.3	-5.9	13.4	101.5	-7.7	-6.3	69.7	
14	10.2	52.6	-9.0	-15.4	33.3	-18.5	23.3	44.4	0.3	0.6	10.4	
15	11.5	34.6	-6.9	-5.3	11.3	6.7	8.2	31.3	6.2	12.5	4.5	
16	-30.9	12.9	1.6	25.1	17.8	2.1	22.7	37.7	-6.7	9.7	13.5	
17	78.3	88.9	14.7	2.5	98.6	20.2	29.3	102.9	-4.2	-14.4	86.4	
18	57.3	44.3	19.0	10.1	100.6	27.4	32.8	105.3	5.2	5.5	87.4	
19	66.3	81.4	10.7	-0.1	99.7	1.9	20.6	105.7	-9.8	-0.4	89.9	
20	-3.2	-12.6	-3.1	1.9	-2.4	-6.3	5.4	105.9	-4.9	5.5	88.5	
21	-5.2	54.3	2.5	-4.7	-6.7	-8.4	-8.0	105.0	-4.6	0.6	87.1	
22	5.7	-14.3	3.6	-9.5	-4.2	-21.3	10.9	22.3	-5.3	-6.0	26.4	
23	8.7	31.9	-6.4	-0.6	8.7	8.0	7.3	24.8	-2.1	12.5	19.5	
24	-2.6	8.4	5.4	13.3	14.7	6.1	21.5	42.5	3.1	9.0	18.1	
25	-15.2	35.6	18.4	1.7	14.4	22.1	27.1	48.6	-5.6	5.9	13.9	
26	55.9	65.6	7.2	12.1	53.8	14.3	21.9	82.5	-1.8	-0.4	49.8	
27	90.7	93.2	-2.3	-1.0	101.1	-0.7	7.3	105.9	-7.0	35.5	92.7	
28	4.2	39.8	-0.1	0.3	50.1	-27.8	39.1	104.2	-11.2	27.5	92.0	
29	-2.1	49.4	2.4	-2.4	3.1	-16.9	13.7	27.1	-16.1	-15.7	9.4	

D-lactate 産生阻害つまり MG 代謝系阻害を示し、かつ正常細胞よりもがん細胞に対して特に強く細胞増殖抑制効果を示す以下の 7 種をヒット化合物とした。

Table. 3-2-3. The hit compounds of MG metabolic pathway inhibitors screening.

Structure	D-lactate inhibition (%) at 10 μ M	Cell growth inhibition (%) at 5 μ M	
		NHBE (normal)	DMS273 (tumor)
	49.4	9.4	27.1
	28.6	1.3	43.8
	52.6	10.4	44.4
	40.8	-2.8	68.2
	40.0	9.7	33.5
	57.5	-4.2	20.6
	40.5	-8.1	31.8

これら化合物の中でも特に以下の化合物 1 について、正常細胞に毒性を示さず、最もがん細胞に対して増殖抑制効果を示していたことから、以降精査することとした。



まず MG 代謝系阻害効果と増殖抑制効果の dose response について、正常細胞 (NHBE) とがん細胞 (DMS273) を比較検討した。

化合物 1 は MG 代謝系阻害効果と増殖抑制効果のいずれについても正常細胞よりもがん細胞に対して特に強く効果を示すということが分かった。

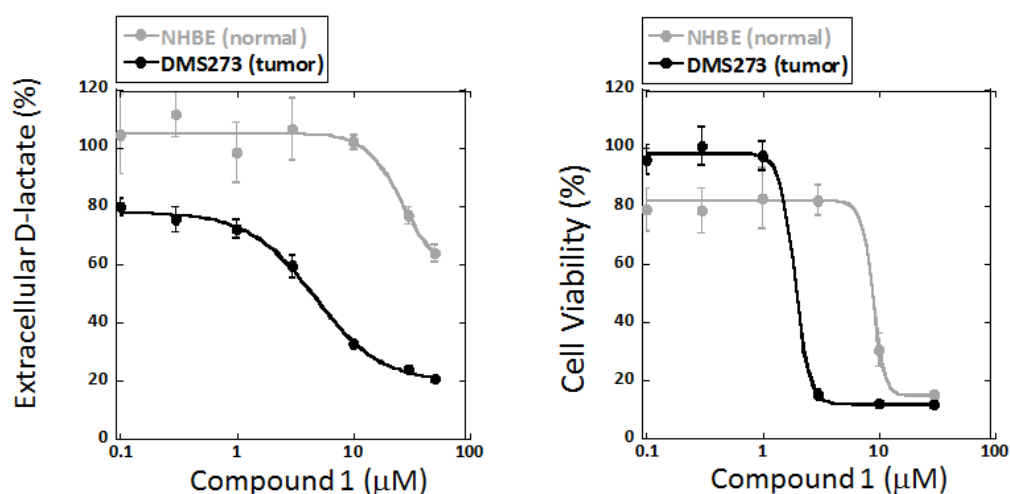


Fig. 3-2-9. Suppression of cell proliferation or MG metabolic pathway by compound 1. Cell Viability assay: DMS273 or NHBE cells were seeded at 5×10^3 cells to 96 well plate. After incubation for 12hr at 37 °C, compound 1 (0-30 μM) were added to cells. After incubation for 48 hr in culture medium at 37 °C, cell viability was evaluated by CCK8 assay. Measurement of extracellular D-lactate: DMS273 or NHBE cells (2×10^5 cells) were incubated with MG (100 μM) and compound 1 (0-50 μM) in DPBS (pH 7.4) for 2hr at 37 °C. D-lactate was detected by SQC probe. Error bars represent S.D.. n=6.

次に化合物 1 による MG 代謝系阻害のメカニズムについて、まず化合物 1 が MG 代謝系のどの段階を阻害しているかを知るため、MG 代謝系の代謝物を測定した。MG 代謝系は MG を酵素 glyoxalase1 (GLO1) が S-D-lactoylglutathione (SLG) に変換し、次に酵素 glyoxalase2 (GLO2) がこれを D-lactate へ変換する。従って、MG (100 μ M)、化合物 1 (10 μ M) を含む DPBS 中で DMS273 細胞を 2 時間インキュベーションし、その後細胞内 SLG 量と細胞外の D-lactate 量を測定した。その結果細胞外 D-lactate および細胞内 SLG は化合物 1 の添加により、大きく減少していることが分かり、化合物 1 は GLO1 による酵素反応を阻害している可能性が考えられた。

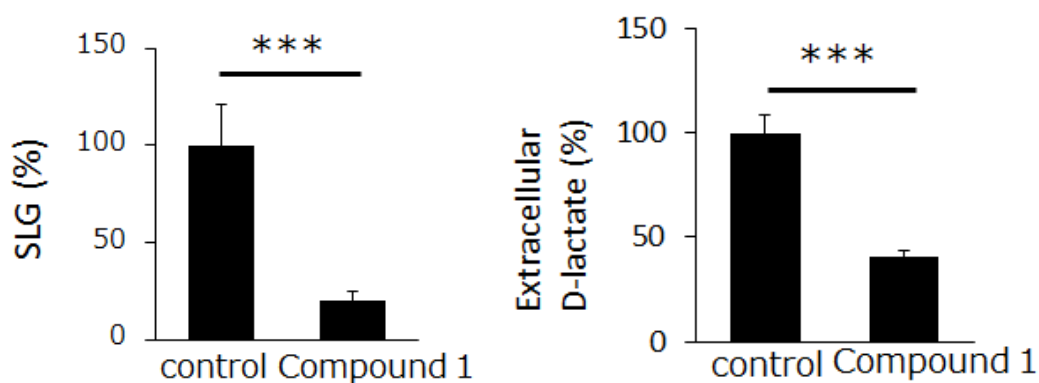


Fig. 3-2-10. Intracellular level of S-D-lactoylglutathione (SLG) and extracellular level of D-lactate. DMS273 cells (2×10^5 cells) were incubated with MG (100 μ M) and compound1 (0 or 10 μ M) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at 37 $^{\circ}$ C. After incubation, extracellular media was collected and cells were lysed and the lysates were measured by LC-MS/MS. Extracellular D-lactate was detected by SQC probe. Error bars represent S.D.. n=4. *** $P < 0.005$.

そこで、GLO1 の精製酵素を用いて代謝物 SLG の産生量を測定することにより化合物 1 による阻害効果を評価したが、化合物 1 が酵素 GLO1 を阻害する様子は見られなかった。化合物 1 による MG 代謝系阻害効果は *in vitro* の実験では再現しないことが分かった。

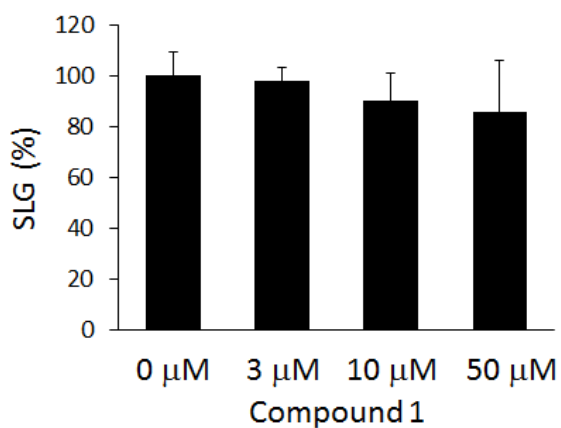


Fig. 3-2-11. Inhibition of compound 1 toward GLO1 in *in vitro* assay.

MG (100 μM), GSH (1 mM) and compound 1 (0-50 μM) were mixed and incubated in DPBS (pH 7.4) for 15 min at r.t. After incubation, glyoxalase 1 (1 μg/mL) was added and incubated for 5 min at r.t. and the glyoxalase 1 activity was quenched with MeOH. The sample was measured by LC-MS/MS. Error bars represent S.D.. n=4.

GLO1 は MG に GSH が付加したヘミアセタール体を基質として代謝物 SLG を産生するため、細胞内 GSH の量は GLO1 の活性に大きく影響すると考えられる。そこで細胞内 GSH 量を測定したところ、化合物 1 を添加した条件において細胞内 GSH 量は大きく減少していた。また、測定サンプルを調整する際に TCEP を加えて還元処理しているため、細胞内 GSH が酸化型の GSSG になることで GSH 量が減っているわけではなく、GSH と GSSG を含めた総量が減少していると言える。

この結果から、化合物 1 は細胞内グルタチオンの総量を減少させることで MG 代謝系を抑制するということが示唆された。

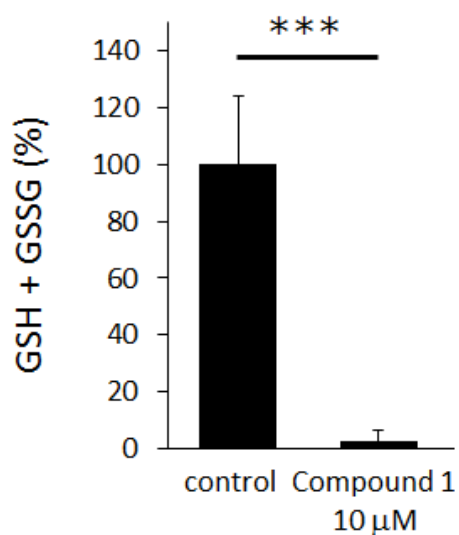


Fig.3-2-12. Intracellular level of GSH + GSSG.

DMS273 cells (2×10^5 cells) were incubated with MG (100 μ M) and compound 1 (0 or 10 μ M) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at 37 °C. After incubation, cells were lysed and the lysates were measured by LC-MS/MS. Error bars represent S.D.. n=4. *** $P < 0.005$.

化合物 1 による阻害効果について、通常培地中 (RPMI1640) でも検討したところ、GSH の減少が確認された。参考として化合物 1 と同様に細胞増殖抑制効果を示したテトラフルオロフタルイミド構造の化合物 (化合物 1' とする) でも検討したが確かに細胞内 GSH は減少していた (化合物 1' の構造と細胞増殖抑制効果については後述 Fig. 3-2-14)。

基質 MG (in DPBS) のみの条件と比べるとその減少具合は小さいが、培地中では栄養素が豊富であり GSH の産生が十分に可能であることため、GSH 減少具合に差をもたらしている理由の 1 つであると考えられる。あるいは化合物 1 が培地中の FBS への吸着することで実効濃度が小さくなっているという可能性も考えられるが、いずれの可能性にせよ化合物 1 が細胞内 GSH を減少させるというはたらきは通常培地中でも行われていると考えられる。

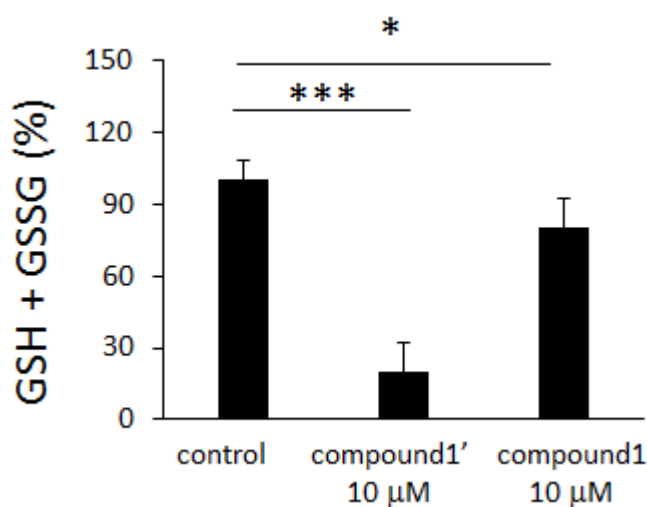


Fig.3-2-13. Intracellular level of GSH + GSSG.

DMS273 cells (2×10^5 cells) were incubated with compound 1 (0 or 10 μ M) or compound 1' (0 or 10 μ M) in culture medium for 2 hr at 37 °C. After incubation,

cells were lysed and the lysates were measured by LC-MS/MS. Error bars represent S.D.. n=4. * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$.

化合物 1'の構造と増殖抑制効果のグラフを以下に記載する。

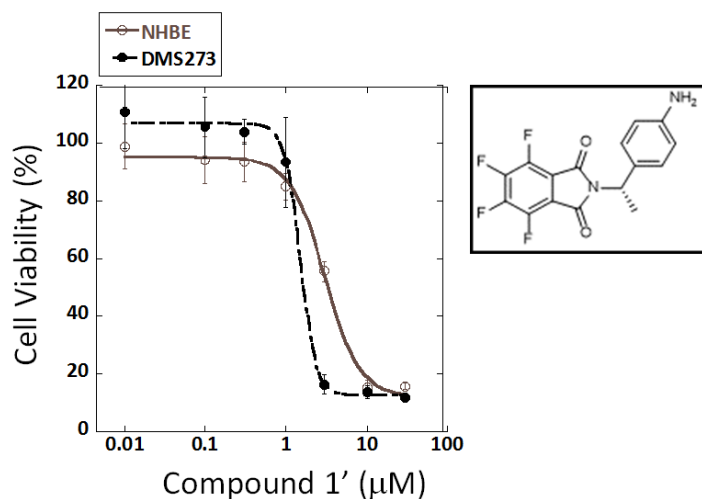


Fig. 3-2-14. Suppression of cell proliferation by compound 1'.

DMS273 or NHBE cells were seeded at 5×10^3 cells to 96 well plate. After incubation for 12hr at 37 °C, compound1' (0-30 μM) were added to cells. After incubation for 48 hr in culture medium at 37 °C, cell viability was evaluated by CCK8 assay. Error bars represent S.D.. n=6.

ここまでの検討から考えると、化合物 1 による MG 代謝系阻害は、細胞内 GSH の減少により、MG と GSH のヘミアセタール体が形成されなくなり、これを基質とする GLO1 の反応が抑制されたため引き起こされたと考えられる。細胞増殖抑制効果の原因としては、化合物 1 により GSH が減少していることから MG 代謝系阻害単体による効果ではなく、GSH が関わる種々の酵素反応や酸化ストレス応答の阻害によるものと考えられる。

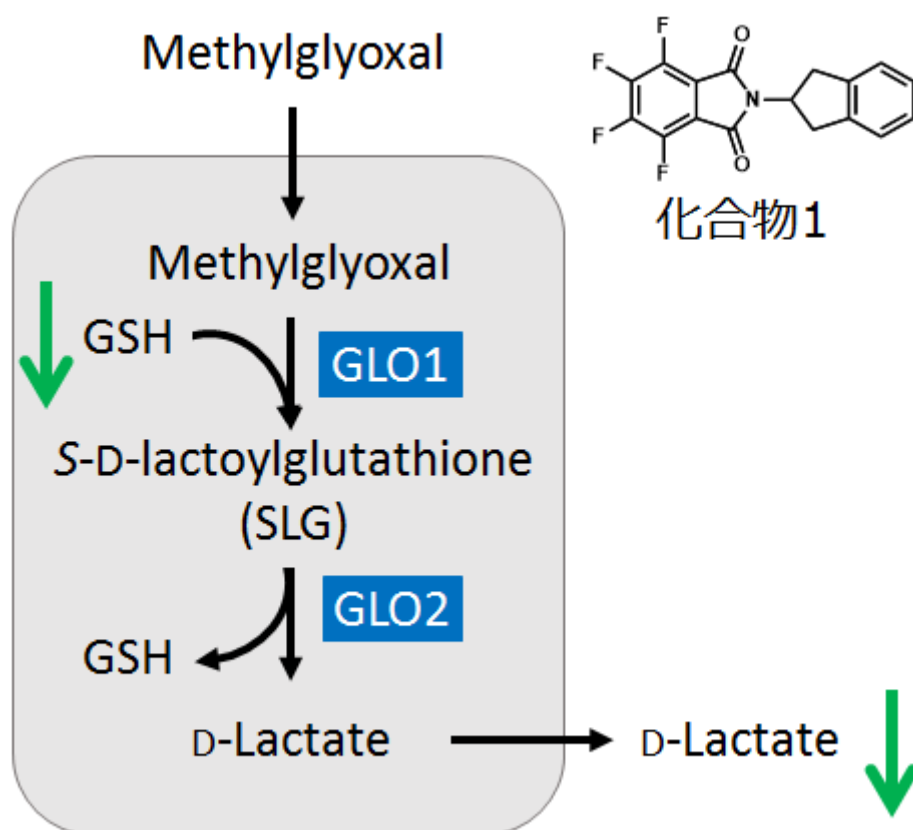


Fig.3-2-15. Compound 1 decrease intracellular GSH level and this causes inhibition of MG metabolic pathway and suppression of cell proliferation.

細胞内 GSH の減少については、①GSH と化合物 1 が非酵素的あるいは酵素的に反応する、②細胞内 GSH の分解系を促進する、③GSH の生成系を阻害する、という可能性が考えられる。

①の可能性についてであるが、酵素 GST (glutathione-S-transferase) によって GSH が 2,4-dinitro chlorobenzene へ求核付加し、Cl が脱離する芳香族求核置換反応を触媒することで GSH 付加体が形成されることが知られており²⁷、GST の活性を吸光検出する試薬として 2,4-dinitro chlorobenzene は用いられる。同様に化合物 1 は GST の基質として GSH と反応している可能性が考えられる。またテトラフルオロイミド構造という電子密度の低い構造を有していることから非酵素的に芳香族求核置換反応を起こして GSH が求核付加し F が脱離する可能性も考えられる。ただし、GSH と反応しうるとことはタンパクの SH 基とも十分反応しうるため、化合物 1 が GSH 分解系の促進や生成阻害に寄与している可能性は十分に考えられる。

化合物 1 による正常細胞 NHBE とがん細胞 DMS273 を用いた MG 代謝系阻害と増殖抑制効果を検討した結果を先述したが (Fig. 3-2-9.)、いずれの効果もがん細胞で特に強く示されていた。これについては、化合物 1 が細胞内 GSH を減少させる効果を有し、SH 基と反応し得るといった性質だけでは説明することは難しく、今後精査する必要がある。

第三節 小括

難治性の肺小細胞がんで亢進している MG 代謝系に対し、POS 系を構築することにより、生細胞系で有効な新規 MG 代謝系阻害剤を取得した。これら新規阻害剤のうち化合物 1 はがん細胞に対して特に強く MG 代謝系阻害効果と増殖抑制効果を示すことが明らかになった。阻害のメカニズムとしては、化合物 1 は MG 代謝系酵素に直接作用するのではなく、細胞内 GSH を減少させることで MG 代謝系を阻害しているということが考えられる。

細胞内 GSH の減少については、①GSH と化合物 1 が非酵素的あるいは酵素的に反応する、②細胞内 GSH の分解系を促進する、③GSH の生成系を阻害する、という可能性が考えられるが、正常細胞とがん細胞における阻害効果が異なる理由も含めて詳しいメカニズムは今後の検討課題である。

化合物 1 以外の新規阻害剤については、テトラフルオロフタルイミド構造を有していない化合物も複数含まれているため、化合物 1 とは異なるメカニズムで MG 代謝系阻害を示すことが期待される。従って、これらの作用メカニズムを精査することで新規 MG 代謝系阻害剤の開発の貢献することができると考えられる。

また、今回開発した NADH 検出蛍光プローブ SQC は、以下に示すように肺小細胞がんに限らず、様々な正常細胞、がん細胞についてその MG 代謝系の活性を生細胞レベルで評価可能であった (Fig. 3-3-1)。開発した蛍光プローブが微量の代謝物を検出可能であること、複数種の細胞種で MG 代謝系の活性を評価可能であることを考えると、POS 法は今後様々な細胞種の代謝活性を評価するアッセイ系であることが強く期待される。

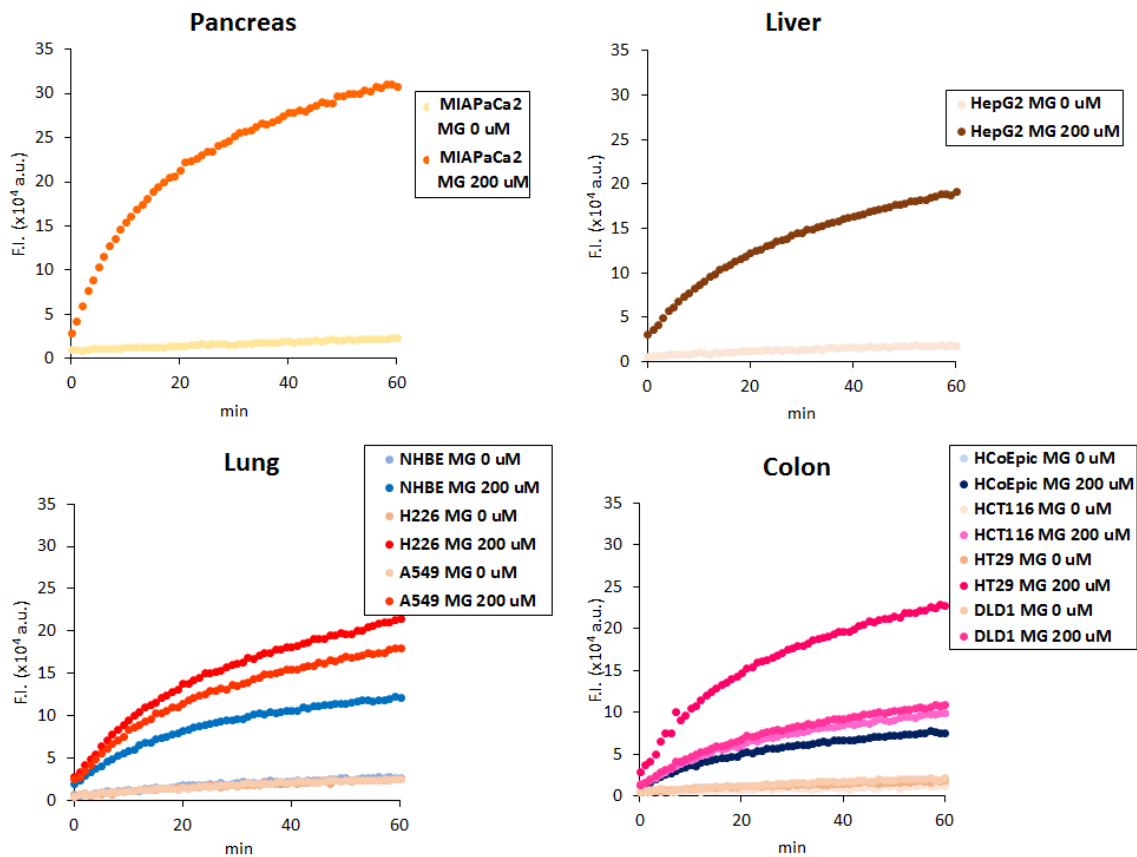


Fig. 3-3-1. Detection of extracellular D-lactate released from normal (NHBE, HCoEpic) or cancer cells (H226, A549, HCT116, HT29, DLD1, HepG2, MIAPaCa2). Cells (2×10^3 cells) were incubated with MG (0 or 200 μM) in DPBS (pH 7.4) for 1 hr at 37 $^{\circ}\text{C}$. After incubation, probe solution was added and the fluorescence intensity was measured by plate reader (Ex./Em. = 355/460 nm). Probe solution: SQC (2 μM), NAD^+ (200 μM), DT-diaphorase (2 U/mL), D-lactate dehydrogenase (2 U/mL) in DPBS (pH 7.4).

第四章 アミノ酸代謝系阻害剤の探索

第四章 アミノ酸代謝系阻害剤の探索

第一節 標的代謝経路の探索

これまでの検討で、がんにおいて亢進している代謝経路に対して、適切な input と output を選択することでその活性を評価することが可能であると分かった。Pathway-Oriented Screening 法は、細胞に添加する input と検出する細胞外の output を変えることで様々な代謝経路を評価することが可能であると考えられるが、用いる input と output の組み合わせとしては、ある input を細胞に添加することで、増加する細胞外代謝物を output として選ぶ必要がある。Input を反映して増加する output を選択することでその input と output の間に介在する代謝経路の活性を評価することが可能となる。本研究では Pathway-Oriented Screening 法というアッセイ手法が、MG 代謝系のほかに適用可能な代謝経路を探索し、適用範囲の拡張を行うこととした (Fig. 4-1-1)。細胞内には様々な代謝経路が存在するが、アミノ酸が窒素源や炭素源としてがん細胞の機能維持に重要であることから²⁸ 本研究ではアミノ酸代謝系に着目し、その活性を Pathway-Oriented Screening 法により評価可能な input と output の組み合わせを探索した。

Question 1: Which input?

Question 2: Which output?

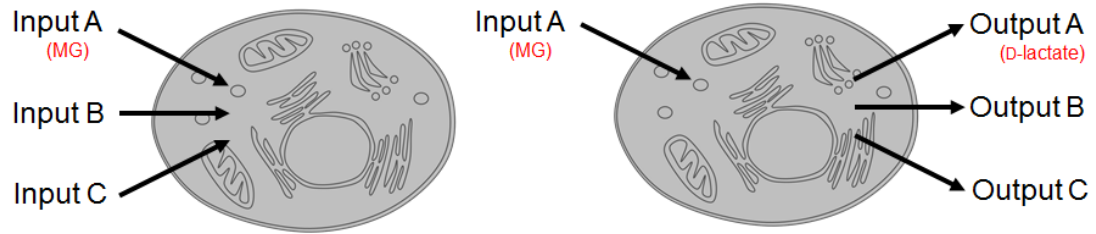
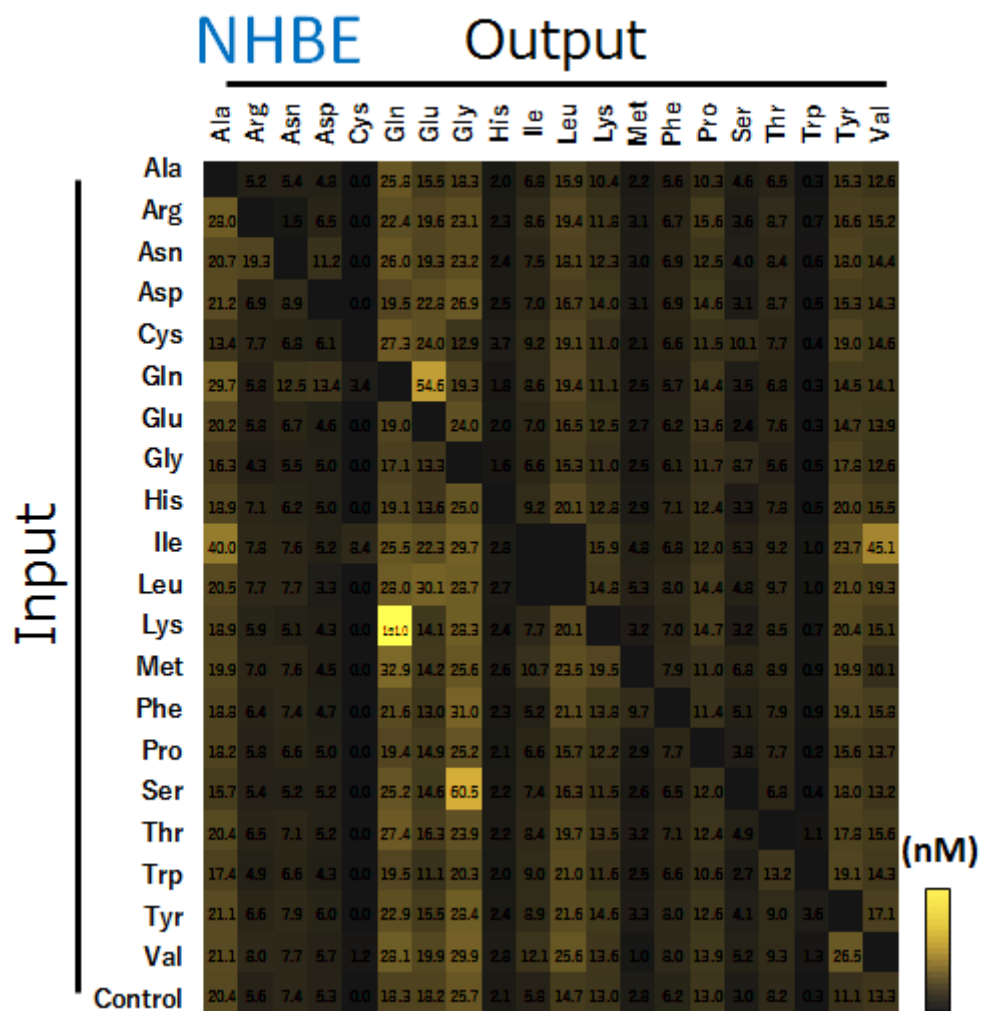


Fig. 4-1-1. Discovery of a pair of input/output for Pathway-Oriented Screening.

各アミノ酸を1種類ずつ正常細胞 (NHBE) またはがん細胞 (A549) に添加してインキュベーション後、細胞外に放出されたアミノ酸量をLC-MS/MSを用いて測定した。



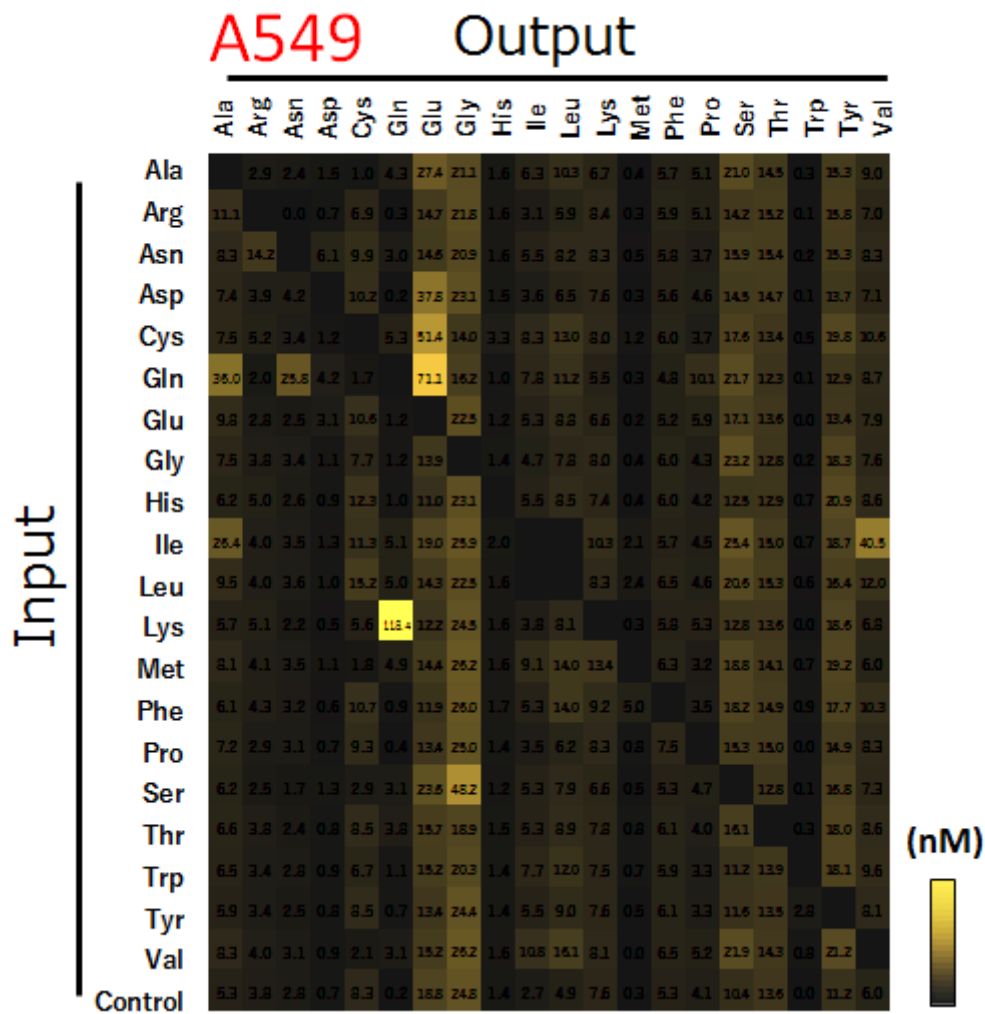


Fig. 4-1-2. Heat map showing concentrations of extracellular metabolites (output, horizontal axis) produced by cells in the presence of the input compound. The unit is nM. NHBE (non-tumorigenic) or A549 (tumorigenic) cells were cultured in DPBS (pH 7.4) containing specified input metabolites (vertical axis, 1 mM) for 4 hr, and the extracellular media was collected, dansylated, and analyzed by LC-MS/MS. The data are average values of 6 experiments.

ヒートマップ最下段の control は、基質を添加しない条件における細胞外アミノ酸量を示しており、これと比較すると、基質の添加に応じて増大する細胞外アミノ酸が確認され、Pathway-Oriented Screening 法が適用可能と期待される複数の input と output の組み合わせが見出された (Fig. 4-1-2)。さらにこの input と output のパターンは細胞種によって異なっており、特に L-Gln の添加後の細胞外 L-Asn、L-Gln の添加後の細胞外 L-Ser の量は以下に示すように A549 細胞で大きく増加している一方で、NHBE 細胞ではそのような大きな増加は見られなかった (Fig. 4-1-3)。この結果から、Gln → Asn (Gln → Ser) という代謝経路が A549 で亢進していることが考えられる。

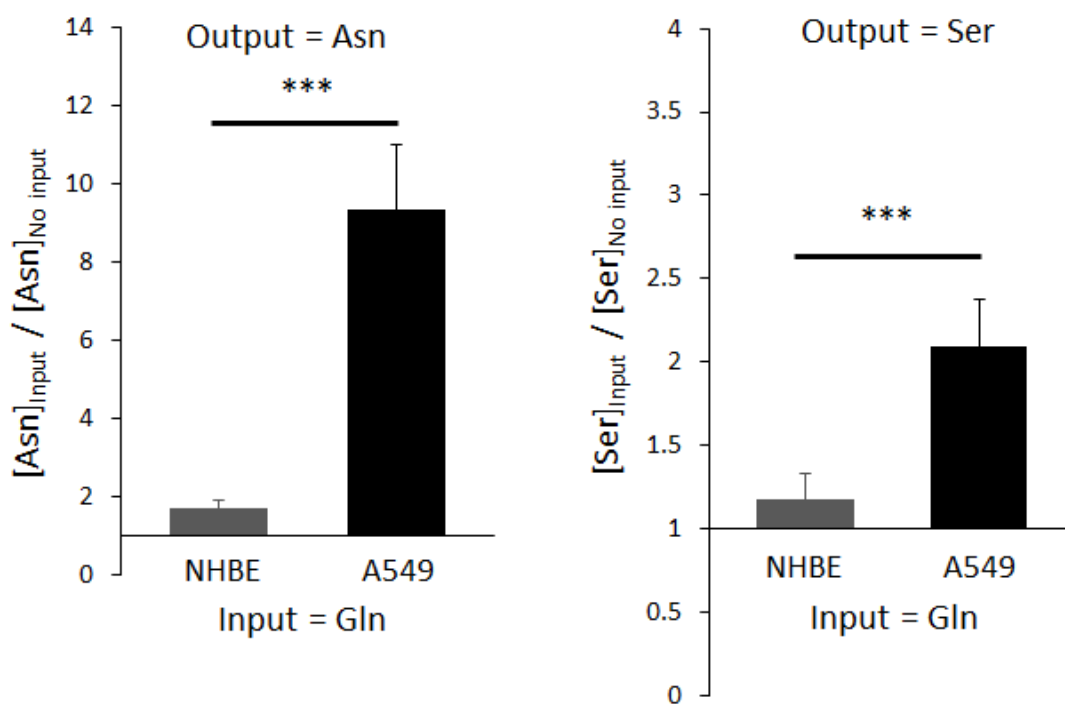


Fig. 4-1-3. The relative amount of extracellular metabolites (L-asparagine, L-serine) released by cells after incubation with 1 mM input (L-glutamine). The value was divided by that without inputs. $n = 6$, and error bar represents S.D..

*** $P < 0.005$

このような細胞外 L-Asn および L-Ser の増加は、これらを産生する代謝経路の基質である glucose や glycine の添加では見られず、L-Gln の添加に特徴的な変化であった。

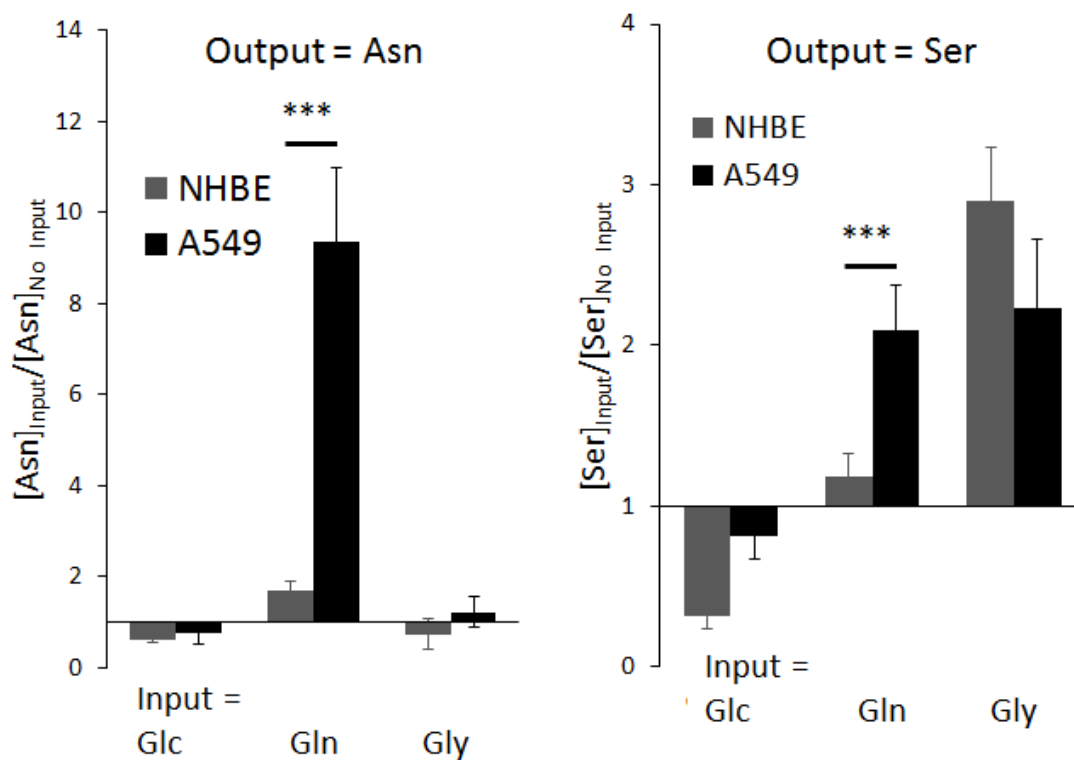


Fig. 4-1-4. The relative amount of extracellular metabolites (L-asparagine, L-serine) released by cells after incubation with 1 mM inputs (D-glucose, L-glutamine, and glycine). The value was divided by that without inputs. n = 6, and error bar represents S.D.. ***P < 0.005

これら Gln → Asn 代謝経路および Gln → Ser 代謝経路という 2 つの経路に着目した理由として、これら代謝経路は以下の図のように L-Gln を代謝するグルタミノリシス、L-Ser の生合成、TCA 回路から構成されると考えられ、がんの創薬標的が多く含まれている経路であることが分かる²⁹⁻³⁵。従ってこれら代謝経路に対して Pathway-Oriented Screening を行うことで、複数の創薬標的を対象に効率良くそれぞれの阻害剤を取得することが可能であると期待される。

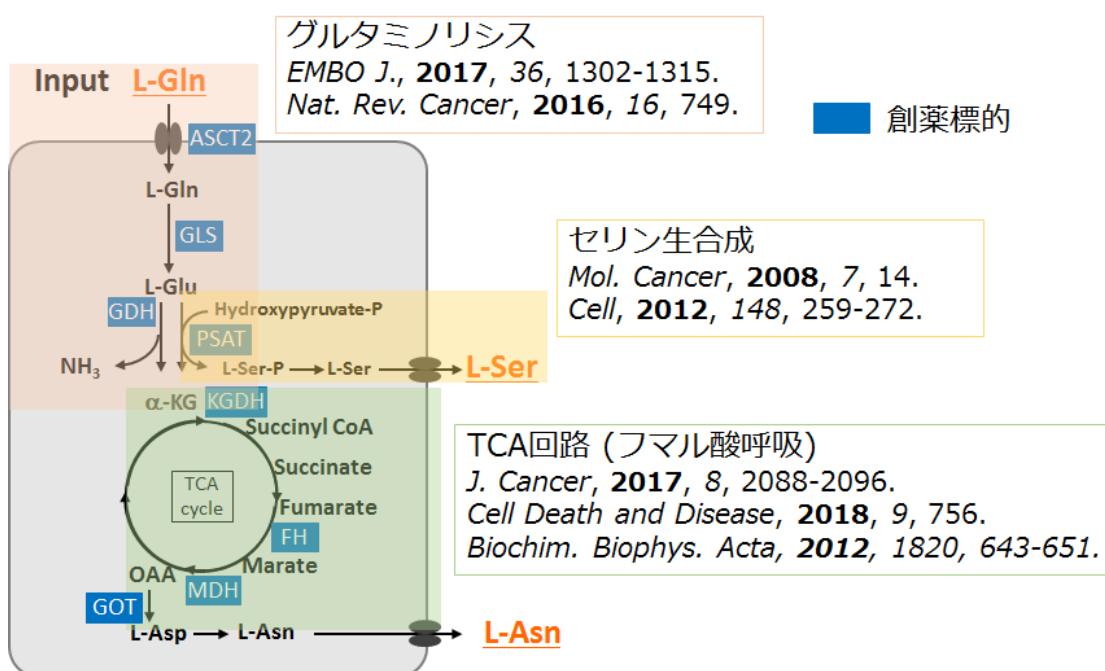


Fig. 4-1-5. The metabolic pathways that produce L-asparagine or L-serine from L-glutamine.

特に、L-Gln を加えた際の細胞外 L-Asn の増加について、各種正常細胞 (NHBE, HCoEpic, HUVEC) とがん細胞 (A549, HeLa, MIAPaCa2, HT29, HepG2) で検討したところ、正常細胞ではほとんど変化しなかった一方でがん細胞では L-Gln の添加により細胞外 L-Asn が大きく増大していた。この検討から確かに Gln → Asn 代謝経路はがんで亢進していることが分かったため、以降は Gln → Asn 代謝経路の活性を評価し、その阻害剤を取得することとした。

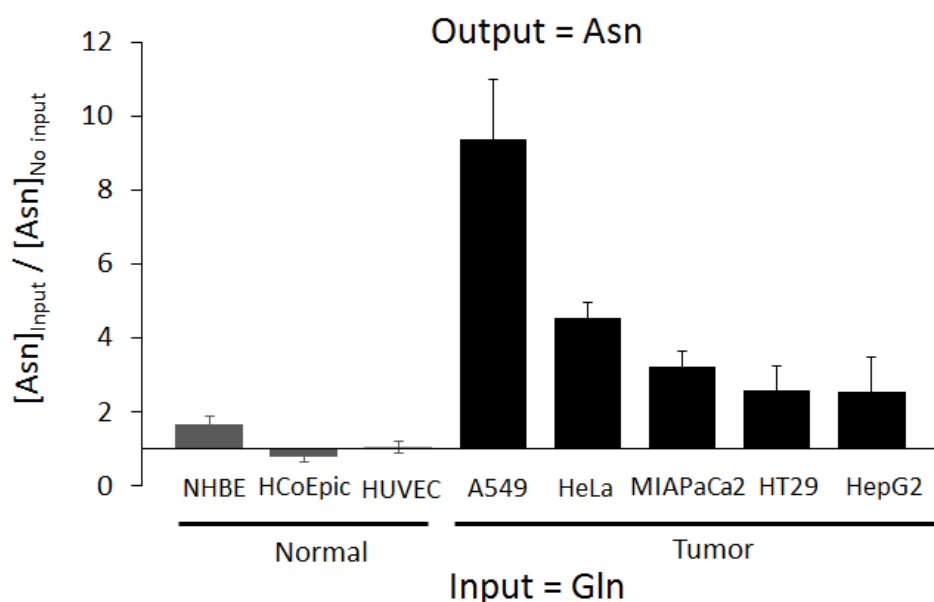


Fig.4-1-6. The relative amount of extracellular L-asparagine released by cells after incubation with 1 mM L-glutamine. The value was divided by that without L-glutamine condition. n = 6, and error bar represents S.D..

Gln → Asn 代謝経路について、Fig. 4-1-5.で示したように細胞に取り込まれた L-Gln が TCA 回路を介して L-Asn へ代謝され、細胞外に放出されていることを確かめることとした。安定同位体で標識された $^{13}\text{C}_5$ L-Gln を用いて検討したところ、これに由来する質量数の大きい L-Asn (m+4) が確認された (Fig. 4-1-7)。L-Gln が TCA 回路を介して L-Asn へ代謝される場合、TCA 回路で一度脱炭酸するため、 $^{13}\text{C}_4$ L-Asn が生成すると予想されることから、質量数の大きい L-Asn (m+4) が確認された結果は L-Gln が TCA 回路を介して L-Asn へ代謝されることを支持するものであると言える。 $^{13}\text{C}_4$ L-Asn 以外に L-Asn も産生されており、TCA 回路を介さずに L-Asn が産生される可能性も考えられるが、L-Asp から L-Asn が生成される際にアミンの原料として $^{13}\text{C}_5$ L-Gln のアミンが使われること、細胞内に存在する内在性の L-Gln に由来する可能性が考えられるため、Fig. 4-1-5.で示したような TCA 回路を介した代謝経路以外の経路が主であるとは考えにくく、がんのグルタミンオリシスという性質と本実験結果から L-Gln 添加後に増加する細胞外 L-Asn は、Fig. 4-1-5.で示した代謝経路を反映したものと考えられる。

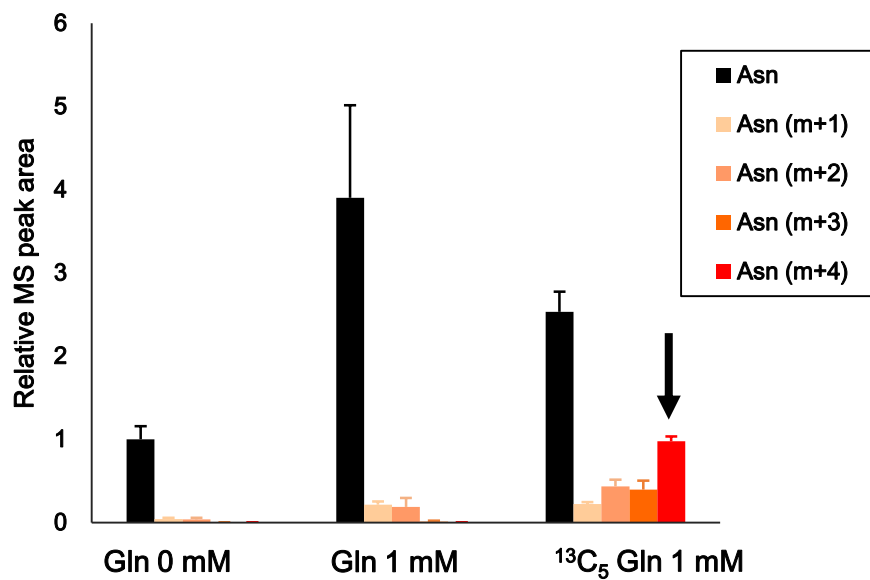


Fig. 4-1-7. The relative MS peaks of extracellular metabolites released from cells incubated with 1 mM inputs (L-glutamine or ¹³C₅ L-glutamine). The graph legend designations of "m+1", "m+2", etc., indicate the increased mass numbers of ¹³C-labelled L-Asparagine. n=4, Error bars represent S.D..

第二節 Gln -> Asn 代謝経路阻害剤の探索

Gln -> Asn 代謝経路を阻害するような化合物を探索することとした。L-Gln を input、L-Asn を output として、output である細胞外の L-Asn の検出は下図のようにカップルドアッセイを組むことで最終的に H₂O₂ を産生させ、これを蛍光検出することとした。

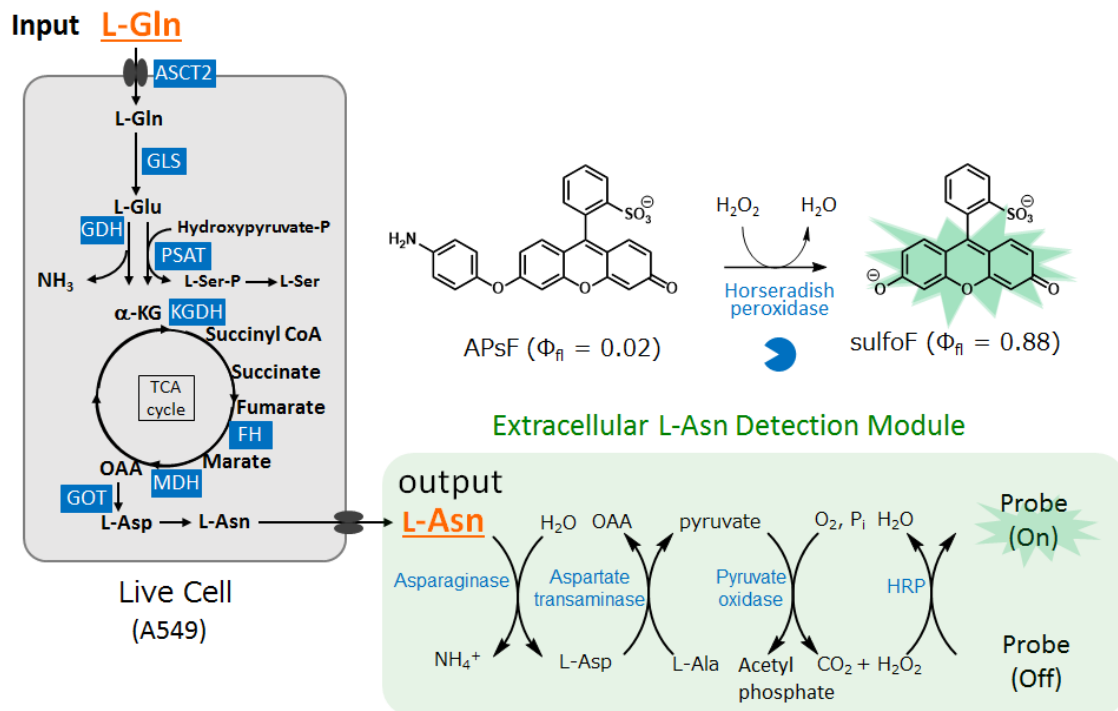


Fig. 4-2-1. POS for identification of compounds to inhibit Gln -> Asn metabolic pathway.

・開発した H₂O₂ 検出蛍光プローブによる Gln -> Asn 代謝経路の評価

A549 細胞を L-Gln 溶液中でインキュベーションした後プローブ溶液を添加し、プレートリーダーにて蛍光強度を測定した。L-Gln 存在下でインキュベーションした条件で蛍光上昇が確認され、L-Asn を変換して H₂O₂ を産生する酵素群を一部含まないプローブ溶液ではその蛍光上昇は抑えられた。MG 代謝系の場合と同様に、L-Gln 添加後に細胞外に放出される L-Asn を開発した蛍光プローブで蛍光検出することに成功し、Gln -> Asn 代謝経路の活性を蛍光プローブにより評価可能であることが示された。さらにアッセイ精度も $Z' = 0.81$ と十分に高いことが分かった。

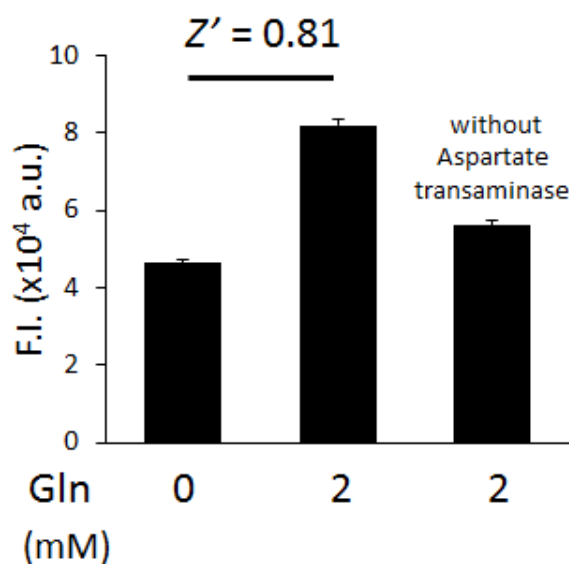


Fig. 4-2-2. Detection of extracellular L-asparagine released from A549 cells.

A549 cells (2×10^3 cells) were incubated with L-glutamine (0 or 2 mM) in DPBS (pH 7.4) for 4 hr at 37 °C. After incubation, probe solution was added and the fluorescence intensity was measured by plate reader (Ex./Em.= 485/535 nm).

Probe solution: APsF (10 μ M), asparagine detection kit enzyme solution (diluted to 1/100, from BIOVISION) in DPBS (pH 7.4). Error bars represent S.D.. n=8.

・ 阻害剤スクリーニングの実施

Gln -> Asn 代謝経路に対して POS 系を構築することが可能であることが示されたため、実際に Gln -> Asn 代謝経路を阻害する化合物の探索を行った。化合物ライブラリーは創薬機構が保有する生理活性既知の 1600 化合物のライブラリーを用いた。

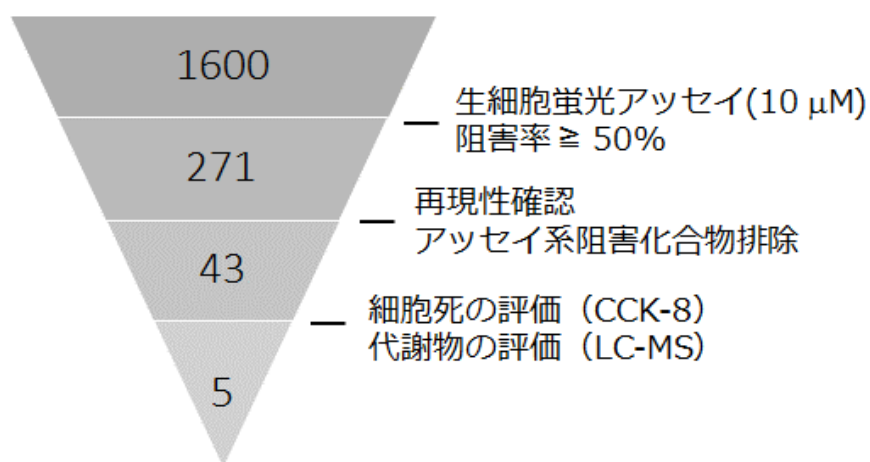


Fig. 4-2-3. Flow chart for screening of the drug-repositioning library.

・1次スクリーニング

L-Gln 添加後細胞外に放出される L-Asn を蛍光プローブで検出し、蛍光減少を示した化合物を Gln → Asn 代謝経路を阻害する化合物とした。L-Gln を添加しない群を positive control、L-Gln を添加した群を negative control として 50 %を超える阻害率を示す化合物を2次スクリーニングに進めた。

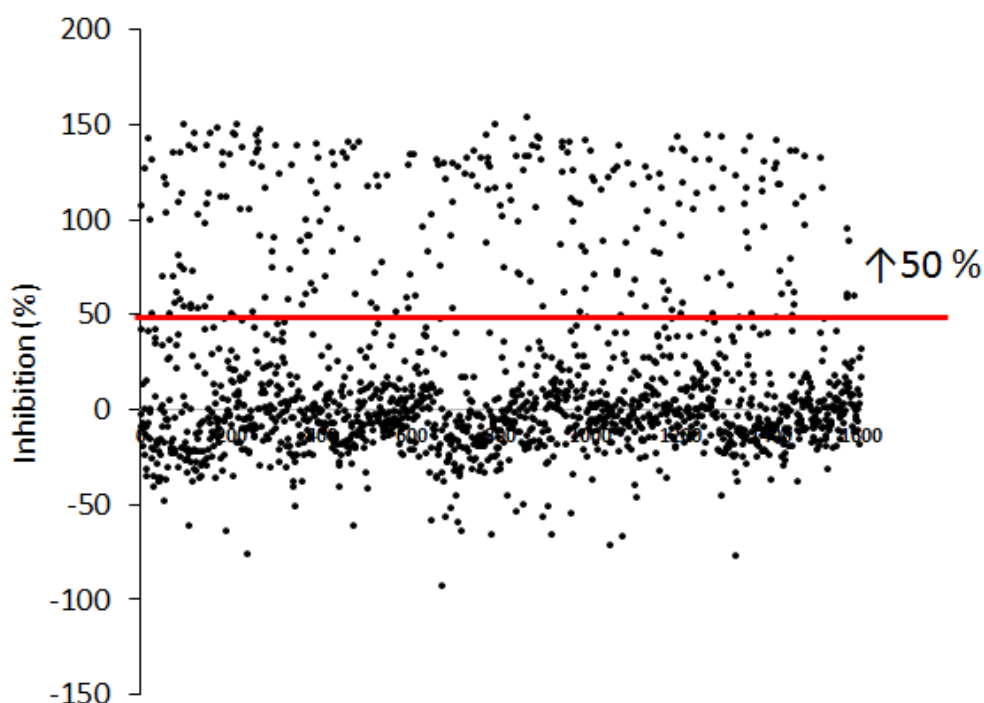


Fig. 4-2-4. The result of 1st screening.

A549 cells (2×10^3 cells) were incubated with L-glutamine (0 or 2 mM) and compounds (0 or 10 μ M) in DPBS (pH 7.4) for 4 hr at 37 °C. The fluorescence intensity (Ex./Em. = 485/535 nm) was measured at 1 hr after probe solution was added. Probe solution: APsF (10 μ M), asparagine detection kit enzyme solution (diluted to 1/100, from BIOVISION) in DPBS (pH 7.4).

・2次スクリーニング

蛍光アッセイの再現性確認およびアッセイ系阻害を示す化合物の排除を行った。

再現性確認（細胞存在下）は1次スクリーニングと同様に行い、細胞非存在下の条件について、positive control: L-Asn 1 μ M, L-Gln 0 mM in DPBS (pH 7.4)、negative control: L-Asn 9 μ M, L-Gln 2 mM in DPBS (pH 7.4) という細胞非存在下の条件で L-Asn を検出することとした。細胞非存在下の条件で蛍光減少を示す化合物は検出系を阻害する化合物と考えられる。細胞非存在下における阻害率が小さい、つまり検出系への阻害が小さく（阻害率 < 10 %）、細胞存在下における阻害率が高い化合物（阻害率 > 80 %）をヒット化合物として3次スクリーニングへ進めた (Fig. 4-2-5)。

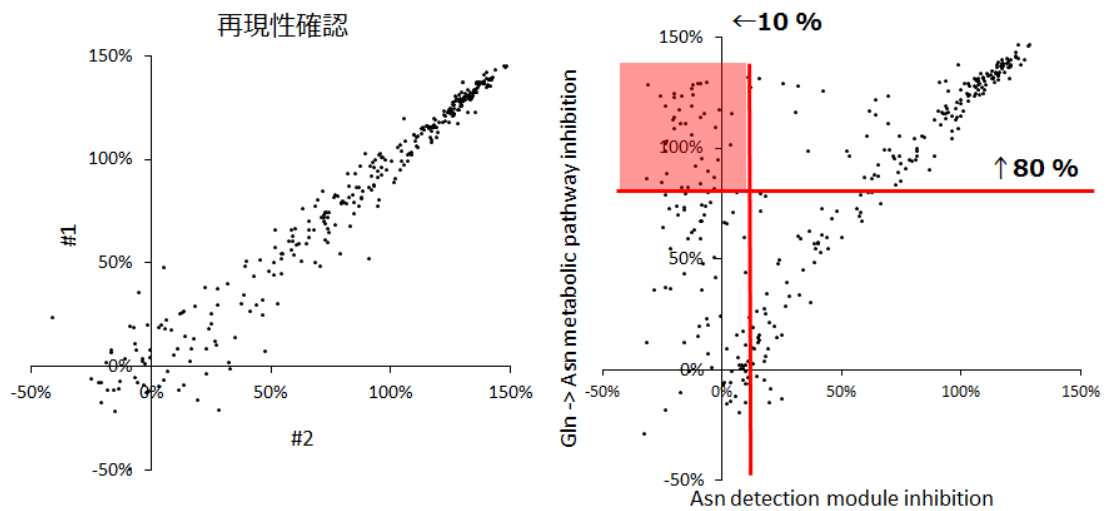


Fig.4-2-5.The result of 2nd screening.

“Presence of cells” conditions: A549 cells (2×10^3 cells) were incubated with L-glutamine (0 or 2 mM) and compounds (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) for 4 hr at 37 °C. “Absence of cells” conditions: L-glutamine (0 or 2 mM), L-asparagine (1 or 9 μM) and compounds (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) were mixed and incubated for 4 hr at 37 °C. The fluorescence intensity (Ex./Em.= 485/535 nm) was measured at 1hr after probe solution was added. Probe solution: probe (10 μM), asparagine detection kit enzyme solution (diluted to 1/100, from BIOVISION) in DPBS (pH 7.4). .

・3次スクリーニング

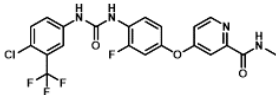
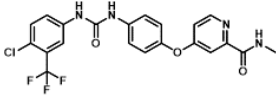
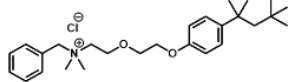
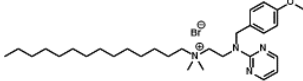
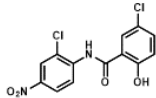
ヒット化合物 42 個について、①細胞増殖阻害能 (CCK8 アッセイ) の検討 ②L-Gln 添加後の細胞外 L-Asn を LC-MS/MS で測定、という 2 つの検討を行った。CCK8 アッセイは MG 代謝系阻害剤スクリーニング時と同様に、化合物添加後 48 時間培地で培養し、細胞増殖能を CCK8 アッセイで評価した。また、細胞外 L-Asn は L-Gln を添加して 4 時間後に細胞外液を回収し、Dansyl 化処理を施した後に LC-MS/MS を用いて測定することで評価した (Table 4-2-1)。

Table 4-2-1. The result of 3rd screening.

	Inhibition of Gln -> Asn (%)			Cell growth inhibition (%)		
	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
1	-27.5	-19.2	-17.9	-10.1	11.5	27.1
2	-40.3	-23.1	-13.1	-36.4	-24.8	23.4
3	-42.8	-31.6	-22.3	-22.2	-8.6	7.5
4	-27.2	-7.9	9.3	-14.3	-7.3	14.8
5	-54.8	-26.1	-11.4	-7.0	-3.8	9.9
6	-36.5	-29.4	-1.0	1.8	9.0	19.2
7	-32.2	-15.5	89.7	-8.7	1.4	15.6
8	-43.5	-32.9	-17.9	-4.9	4.7	18.9
9	-62.8	-28.9	-5.9	-1.1	10.0	26.8
10	6.3	-19.6	7.7	-24.0	-20.2	7.4
11	-29.6	-37.2	-1.7	-19.8	-9.8	12.5
12	-35.2	75.1	79.9	-13.7	-1.8	41.3
13	-15.6	-28.9	-10.6	2.7	5.5	19.3
14	-21.8	-11.7	-8.7	8.5	12.2	26.2
15	-34.1	-32.6	21.6	3.0	21.0	45.5
16	-33.7	-25.6	1.5	0.3	3.6	19.4
17	-7.2	62.0	79.5	-8.9	12.7	15.7
18	-1.5	-22.6	72.2	-20.7	-6.7	12.5
19	-28.0	-8.2	-10.0	-9.2	4.2	3.7
20	-12.2	-36.0	79.0	-6.1	3.5	10.7
21	-18.6	-40.8	-4.3	4.4	11.8	11.0
22	8.5	-11.2	68.6	0.0	15.0	68.6
23	-13.2	-26.8	-16.3	3.0	10.8	6.9
24	-38.2	-53.4	-23.4	-3.0	11.4	14.2
25	-23.2	-57.5	-16.0	-14.3	5.6	4.2
26	-7.9	12.4	37.5	-11.8	6.5	91.5
27	-11.0	-31.2	-15.5	-9.0	-1.7	0.4
28	-21.8	-29.9	53.0	-6.9	-2.4	6.4
29	-2.2	-30.6	89.7	1.4	9.7	61.7
30	-9.2	75.3	79.9	1.8	8.6	3.2
31	-32.8	14.6	-4.5	2.8	10.3	6.5
32	-73.6	-63.6	-15.0	2.2	5.9	-0.7
33	-40.2	-33.7	-10.8	-10.3	-5.2	-7.4
34	-17.2	-43.0	21.8	-42.1	-6.4	-4.9
35	-5.7	-14.5	31.3	-43.9	7.1	3.4
36	-16.2	-24.4	-3.8	-37.0	3.0	7.3
37	2.1	-42.1	17.6	-29.8	18.2	60.5
38	-26.7	-34.2	33.8	-15.9	15.9	9.6
39	-32.9	-33.0	89.0	-7.9	28.8	60.6
40	-30.9	-69.6	-16.1	-1.3	9.5	12.5
41	-23.1	-3.5	32.2	-10.6	-20.0	-14.7
42	-9.4	-37.2	15.3	-66.5	-17.7	9.4

42 種の候補化合物のうち、細胞外 L-Asn の減少効果および細胞増殖抑制効果の両方を示す以下の 5 種の化合物をヒット化合物とした。

Table 4-2-2. The hit compounds to inhibit Gln → Asn metabolic pathway of live cells.

Structure	Name	Asn inhibition (%) at 10 μM	Cell growth inhibition (%) at 10 μM	Comment
	Regorafenib	89.7	61.7	Tyrosine kinase inhibitor Anti-tumor drug
	Sorafenib	89.0	60.6	Tyrosine kinase inhibitor Anti-tumor drug
	Benzethonium chloride	68.6	68.6	Monocationic detergent Anti-bacterial drug
	Thonzonium bromide	37.5	91.5	Monocationic detergent Anti-bacterial drug
	Niclosamide	79.9	41.3	Anthelmintic, Helmintic DNA damage Mitochondria uncoupler

・ヒット化合物の精査

これらヒット化合物が Gln → Asn 代謝経路を阻害することに関して、この代謝経路に関わる細胞内代謝物について検討した。L-Gln 存在下でヒット化合物を添加してインキュベーション後、細胞内代謝物を抽出した。細胞内アミノ酸は Dansyl 化処理後に LC-MS/MS にて検出し、細胞内 ATP は ATP 検出キット (Cell Titer Glo 2.0) を用いてプレートリーダーにて発光測定することで検出した。

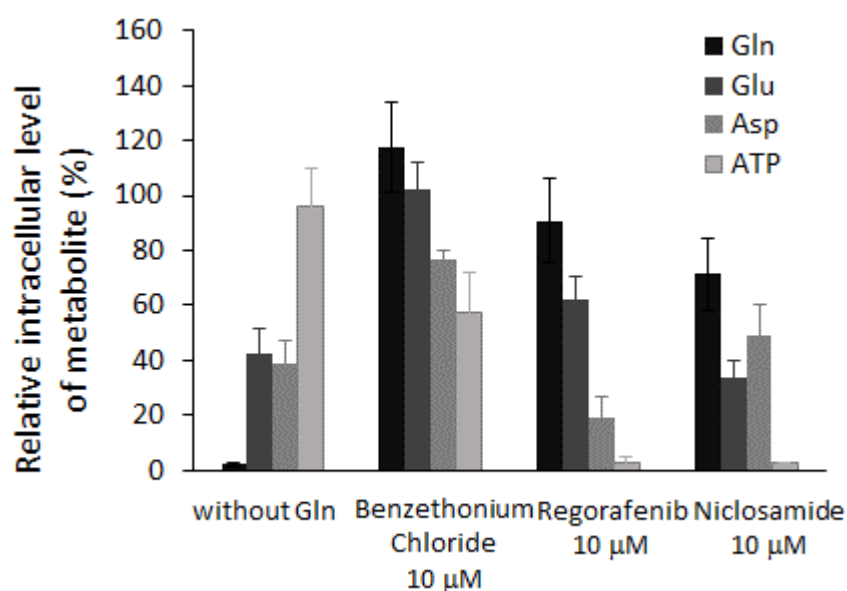


Fig. 4-2-6. Intracellular level of metabolites after treatment of benzethonium chloride, regorafenib or niclosamide. A549 cells (1.2×10^5 cells) were incubated with L-glutamine (0 or 2 mM) and benzethonium chloride, regorafenib or niclosamide (0 or 10 μ M) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at 37 °C. After incubation, cells were lysed and the lysates were measured by LC-MS/MS (for detection of Gln, Glu and Asp). Intracellular ATP level was measured with Cell Titer Glo 2.0 solution by plate reader. Error bars represent S.D.. n=4.

これら 5 つのヒット化合物はキナーゼ阻害剤 (Regorafenib, Sorafenib)、界面活性剤 (Benzethonium chloride, Thonzonium bromide)、アンカップラー (Niclosamide) に分類されるが、いずれも Gln → Asn 代謝経路に関わる代謝物の減少が確認された (Fig. 4-2-6)。

Niclosamide はアンカップラーとして機能し、細胞増殖抑制を示すことが知られるため³⁶、ミトコンドリアの膜電位を消失させ、その機能を阻害することで Gln → Asn 代謝経路に対する阻害を示したと考えられる。キナーゼ阻害剤と界面活性剤については Gln → Asn 代謝経路に関わるアミノ酸と ATP の減少が見られたことから、Gln → Asn 代謝経路に関わるいずれかの酵素活性を抑制し、TCA 回路を阻害したことで ATP の産生を阻害したと考えられる。

特にヒット化合物として取得した Regorafenib、Sorafenib はジフェニル尿素系のマルチキナーゼ阻害剤であり、血管新生に関わるキナーゼ (VEGFR1-3) や細胞増殖に関わるキナーゼ (KIT、RET、Raf-1、BRaf) を阻害することにより抗腫瘍効果を示し^{37,38}、Regorafenib は肝細胞がんや消化管間質腫瘍 (GIST)、Sorafenib は腎がんや肝細胞に対する抗がん剤として承認されている³⁹。このようなキナーゼ阻害剤が Gln → Asn 代謝経路を阻害することは非常に興味深いため、以降は Regorafenib について精査を進めることとした。

・ Regorafenib の阻害標的酵素について

^{13}C で安定同位体標識された L-Gln ($^{13}\text{C}_5$ L-Gln) を用いて得られた阻害剤の標的酵素を探索した。 $^{13}\text{C}_5$ L-Gln を添加し 2 時間インキュベーションした後、細胞内の代謝物を抽出して $^{13}\text{C}_5$ L-Gln に由来する細胞内の各アミノ酸 ($^{13}\text{C}_5$ L-Gln、 $^{13}\text{C}_5$ L-Glu、 $^{13}\text{C}_4$ L-Asp、 $^{13}\text{C}_4$ L-Asn) を LC-MS/MS にて測定した。

以下のグラフは Regorafenib を添加しない場合のコントロール群における各アミノ酸量を 100%とした場合の Regorafenib 添加群における各アミノ酸量を表している。

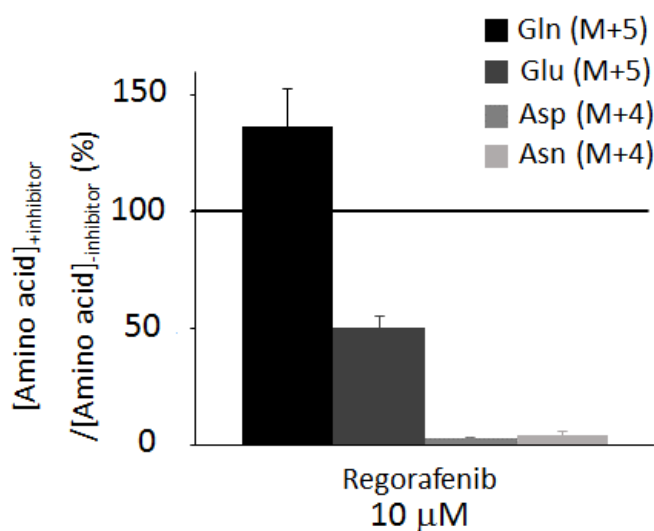


Fig.4-2-7. Intracellular level of metabolites after treatment of regorafenib.

A549 cells (1.2×10^5 cells) were incubated with $^{13}\text{C}_5$ L-glutamine (2 mM) and regorafenib (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at 37 °C. After incubation, cells were lysed and the lysates were measured by LC-MS/MS. The value was divided by that without regorafenib condition. Error bars represent S.D.. n=4.

Regorafenib を添加することで細胞内 $^{13}\text{C}_5$ L-Gln は増加し、 $^{13}\text{C}_5$ L-Glu、 $^{13}\text{C}_4$ L-Asp、 $^{13}\text{C}_4$ L-Asn は減少することから、Regorafenib は L-Gln を L-Glu へ代謝する酵素 GLS (glutaminase) を標的の 1 つとして阻害することを強く示唆する結果であると考えられる。

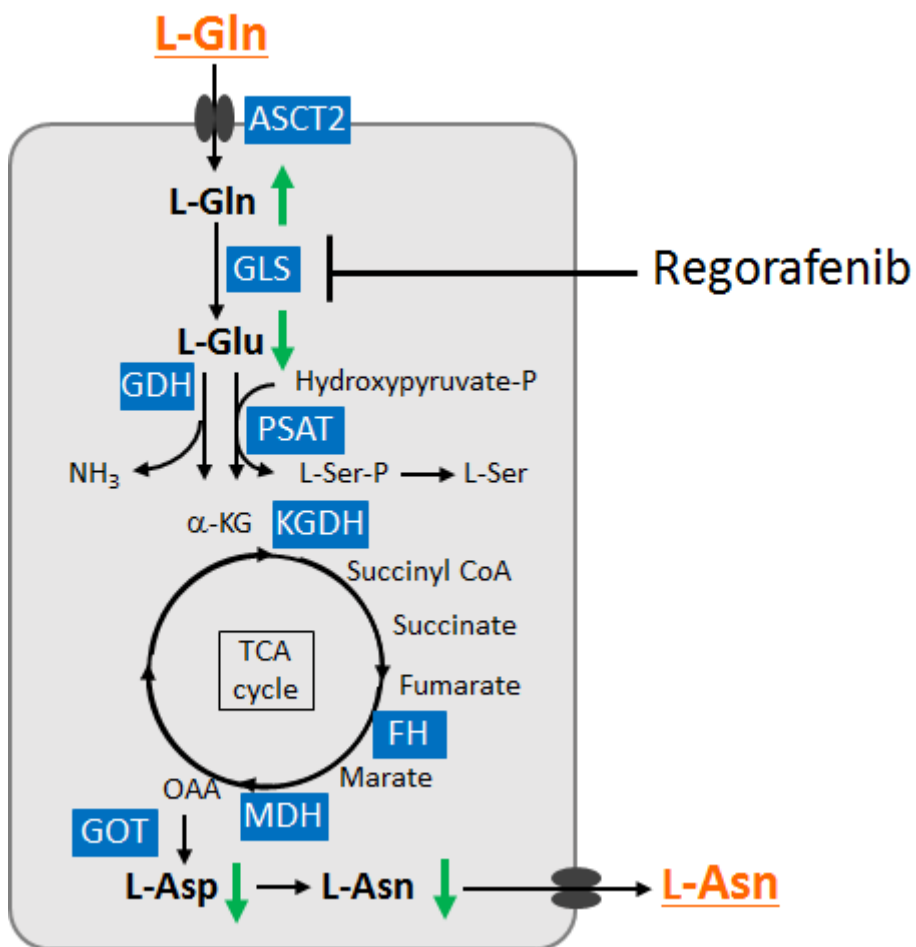


Fig. 4-2-8. Regorafenib is assumed to inhibit GLS.

・ Regorafenib の阻害メカニズムについて

Regorafenib が GLS を阻害することが強く示唆されたが、キナーゼ阻害剤が GLS を阻害するメカニズムについて以下のことが考えられる。

まず、本研究で用いた細胞 A549 では GLS のサブタイプのうち、GLS1 を主に利用してグルタミン代謝を行っていることが知られている⁴⁰。さらに重要な点として、GLS1 は Ras/Raf/Mek/Erk シグナルによって活性化される性質を有することが報告されており⁴⁰、そして得られた阻害剤 Regorafenib は Raf-1 を阻害することが知られている^{37,42}。

以上の先行研究から、KRas 変異を有する A549 細胞において、活性化されている Raf-1 を Regorafenib が阻害することで GLS1 の活性が抑制され、その結果 Gln → Asn 代謝経路が阻害されたと考えられる。

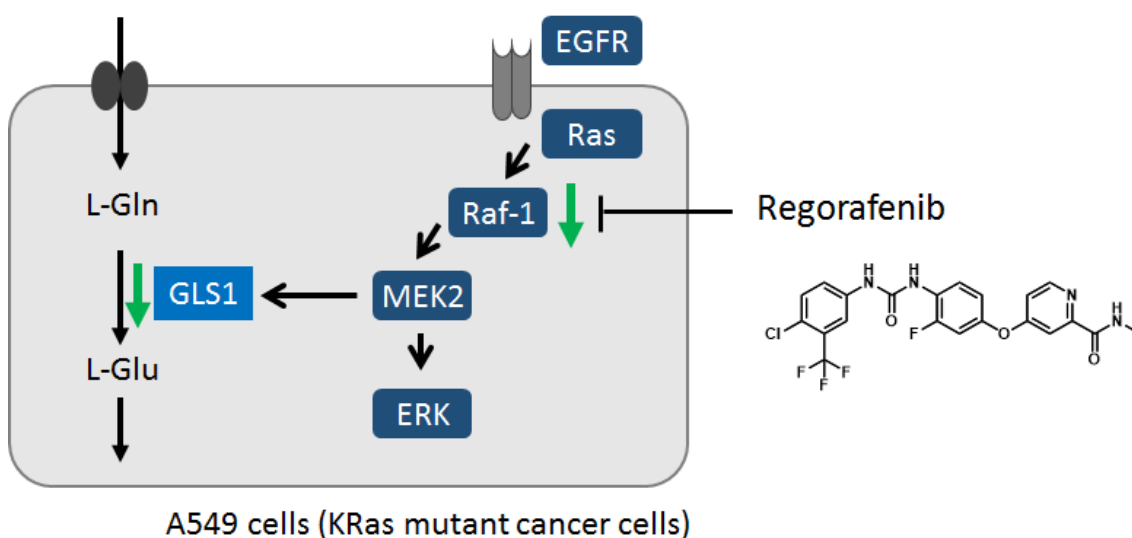


Fig. 4-2-9. The probable mechanism of inhibition toward GLS by regorafenib.

・ヒット化合物 Benzethonium Chloride について

Benzethonium Chloride はモノカチオンの界面活性剤として知られ、抗菌活性を示す化合物である⁴³。この化合物についても Regorafenib と同様に $^{13}\text{C}_5$ L-Gln を用いたアッセイを行った結果を以下に示す (Fig. 4-2-10)。

$^{13}\text{C}_5$ L-Gln は増加し、 $^{13}\text{C}_5$ L-Glu、 $^{13}\text{C}_4$ L-Asp、 $^{13}\text{C}_4$ L-Asn は減少しているが、

Regorafenib とは阻害のパターンが異なる。この結果と、Benzethonium Chloride がモノカチオンの界面活性剤であることを考えると、Gln \rightarrow Asn 代謝経路に関わる複数の酵素を阻害していることが予想される。

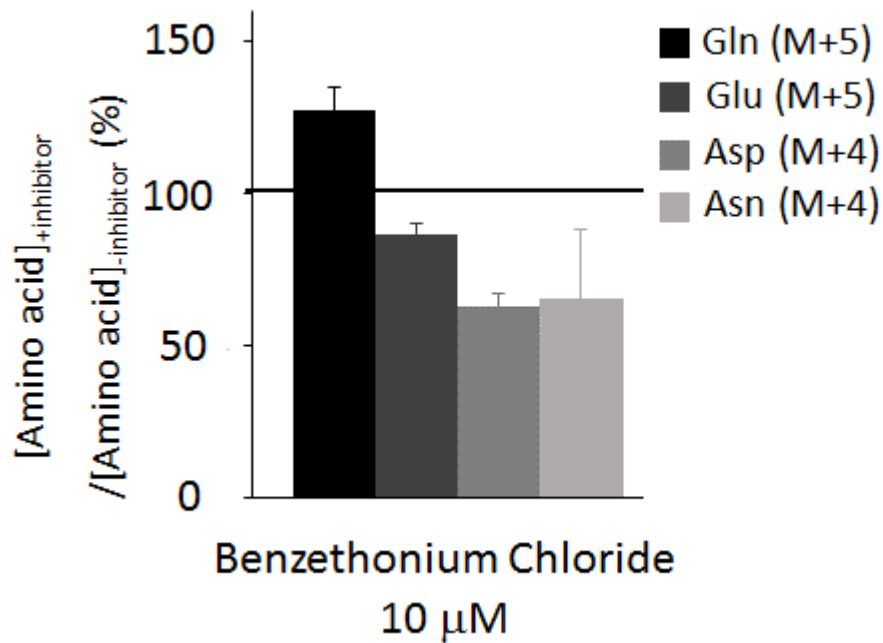


Fig.4-2-10. Intracellular level of metabolites after treatment of benzethonium chloride.

A549 cells (1.2×10^5 cells) were incubated with $^{13}\text{C}_5$ L-glutamine (2 mM) and benzethonium chloride (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at 37 °C. After incubation, cells were lysed and the lysates were measured by LC-MS/MS. The value was divided by that without benzethonium chloride condition. Error bars represent S.D.. n=4.

また、Benzethonium Chloride による増殖抑制効果についてであるが、Gln → Asn 代謝経路を阻害することから、細胞の主な栄養・エネルギー源である glucose と L-Gln のうち L-Gln に由来する部分を阻害することが考えられるため、解糖系阻害剤と併用することによる抗がん作用を検討することとした。通常培地において、解糖系阻害剤 2-DG (20 mM) とともに Benzethonium Chloride (0-30 μM) を添加し、24 時間培養した。

解糖系阻害剤 2-DG 存在下では、Benzethonium Chloride は A549 細胞に対して特に強く増殖抑制効果を示すことが明らかとなった (Fig. 4-2-11)。多くのがんではグルタミン代謝が亢進しており、この代謝にエネルギーや栄養源の確保を依存していることが知られている。解糖系阻害剤存在下では特にエネルギーや栄養源をグルタミン代謝に頼る必要があるため、正常細胞とがん細胞におけるエネルギーや栄養源の要求性の差がこのようながん選択的な増殖抑制効果を示す結果となったと考えられる。

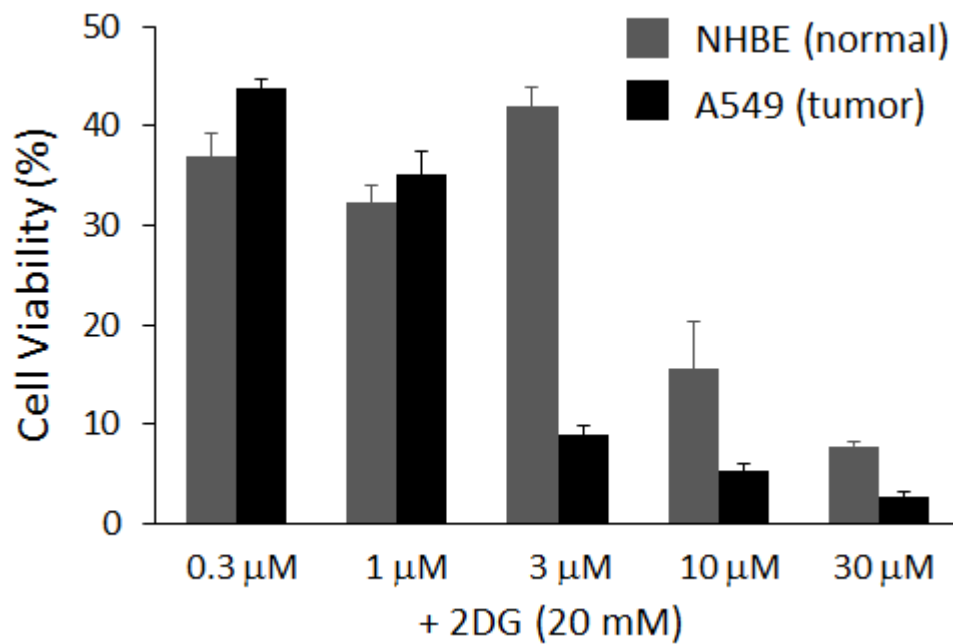


Fig. 4-2-11. Cell growth inhibition of benzethonium chloride with 2-DG.

A549 or NHBE cells were seeded at 5×10^3 cells to 96 well plate. After incubation in culture medium with 2-DG (20 mM) for 12 hr at 37 °C, benzethonium chloride (0-30 μM) were added to cells. After incubation for 24 hr at 37 °C, cell viability was measured by CCK8 assay. Error bars represent S.D.. n=6.

Benzethonium Chloride は多くのがん種に対して細胞増殖抑制効果を示し、特に咽頭がんについて、正常細胞と比較して選択的な増殖抑制効果を有し、モデルマウスでの *in vivo* 実験で抗腫瘍効果を示すことが報告されている⁴³。Benzethonium Chloride によってミトコンドリア膜電位の低下がみられることからこれが増殖抑制効果の要因として挙げられているが、本研究で Benzethonium Chloride が Gln → Asn 代謝経路を阻害することが明らかになり、この阻害によって ATP 産生が阻害され、ミトコンドリア膜電位低下に繋がると考えられる。アンカップラーとしてミトコンドリアの膜電位を減少させることでミトコンドリアの機能を低下させ、Gln → Asn 代謝経路を阻害している可能性は考えられるが、以下の ¹³C₅ L-Gln を用いた検討から Niclosamide を含むアンカップラーによる Gln → Asn 代謝経路阻害のパターンとは異なることが分かっている。

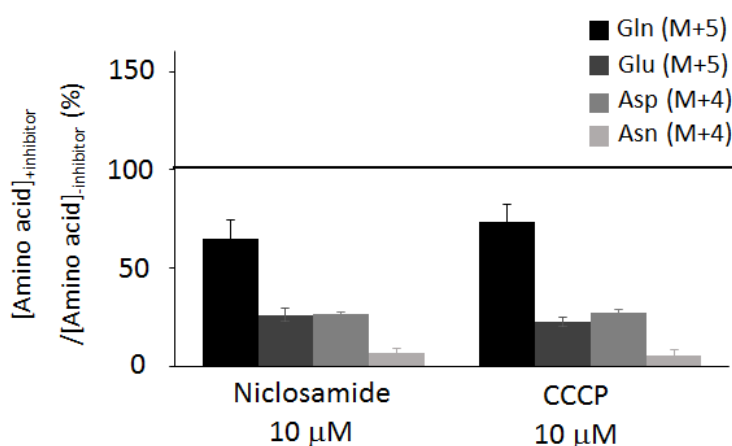


Fig. 4-2-12. Intracellular level of metabolites after treatment of niclosamide or CCCP. A549 cells (1.2×10^5 cells) were incubated with ¹³C₅ L-glutamine (2 mM) and niclosamide (0 or 10 μM) or CCCP (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) for 2 hr at 37 °C. After incubation, cells were lysed and the lysates were measured by LC-

MS/MS. The value was divided by that without inhibitor condition. Error bars represent S.D.. n=4.

これらヒット化合物の標的について、 $^{13}\text{C}_5$ L-Gln を用いた検討から Regorafenib と Benzethonium chloride の標的は異なることが分かる。Sorafenib は Regorafenib の類縁体であることからその標的は同じと推測される。Thonzonium bromide は Benzethonium chloride と同様にモノカチオンの界面活性剤であることから、その標的は同じと予想される。得られた新規阻害剤は Gln \rightarrow Asn 代謝経路を止めるという点では共通しているもの、その標的酵素はキナーゼ阻害剤 (Regorafenib、Sorafenib) とモノカチオン界面活性剤 (Benzethonium chloride、Thonzonium bromide) で異なると考えられる。従って、Gln \rightarrow Asn 代謝経路中で創薬標的として重要とされる酵素は複数存在するが、Pathway-Oriented Screening 法によって Gln \rightarrow Asn 代謝経路を抑え、かつ標的酵素が異なる複数種の阻害剤を取得することに成功したと言える。

・ヒット化合物の Viability 抑制効果について

これらヒット化合物の Viability 抑制効果について正常細胞 (NHBE) とがん細胞 (A549) で比較した。L-Gln のみが栄養源として供給される条件で細胞に阻害剤を添加し、2 時間のインキュベーション後に calcein-AM を用いてその蛍光強度から細胞の Viability を算出した (Fig. 4-2-13)。

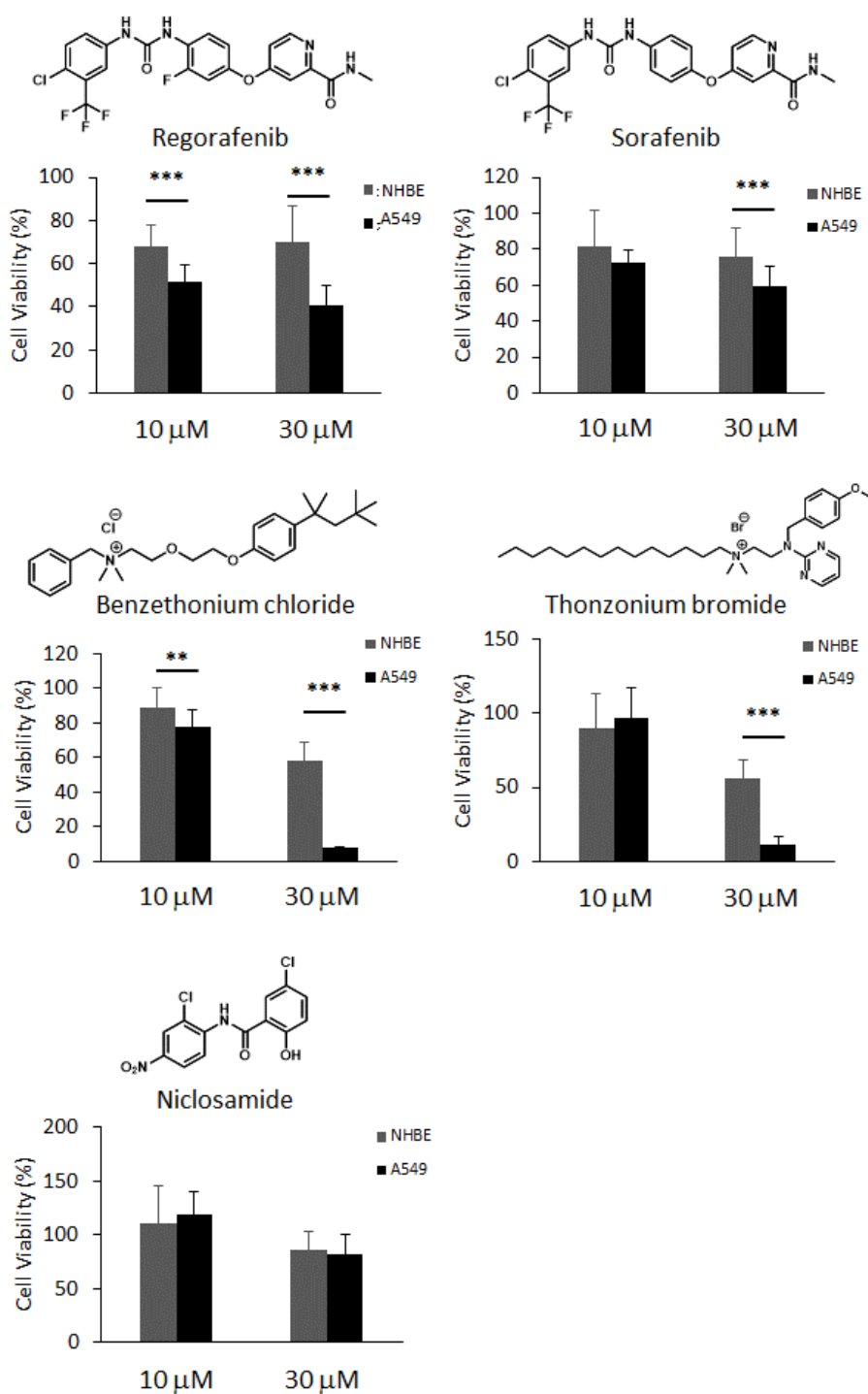


Fig.4-2-13. Cell viability after treatment of hit compounds. A549 or NHBE cells (2×10^3 cells) were incubated with L-glutamine (2 mM) and hit compounds (0, 10 or 30 μM) in DPBS (pH 7.4) for 2hr at 37 °C. After incubation, calcein-AM (1 μM)

was added and incubated for 1hr at 37 °C. The fluorescence intensity of calcein was measured by plate reader. Ex./Em=485/535 nm. Error bars represent S.D.. n=16. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$

アンカプラーである Niclosamide は正常細胞 (NHBE) およびがん細胞 (A549) に対する Viability 抑制は変わらなかった。

キナーゼ阻害剤である Regorafenib、Sorafenib は L-Gln のみが栄養源として供給される条件下において正常細胞 (NHBE) よりもがん細胞 (A549) に対して特に強く Viability を抑制することが判明した。Regorafenib、Sorafenib がキナーゼ阻害剤として増殖シグナルに関わる VEGFR や Raf-1 を阻害することから、これらによる Gln \rightarrow Asn 代謝経路阻害がこのような Viability 抑制の主な要因であると断定することは困難であるが、

Regorafenib や Sorafenib がキナーゼ阻害剤としてはたらくほかに Gln \rightarrow Asn 代謝経路を阻害することが本研究で明らかになったことは biological な知見を与えたと思われる。実際の腫瘍の増殖を抑制するにあたり、キナーゼ阻害剤として細胞増殖に必要なシグナル経路を阻害するだけでなく、L-Gln に由来する栄養・エネルギーの産生を抑制することも抗腫瘍効果に寄与していることが本研究結果から推察される。

モノカチオンの界面活性剤である Benzethonium chloride、Thonzonium bromide について、これらはいずれも A549 細胞に対して特に強く Viability を抑制していた。

Benzethonium chloride と 2-DG を用いた細胞増殖抑制効果を検討した結果から、Benzethonium chloride、Thonzonium bromide の Gln \rightarrow Asn 代謝経路阻害はこれらによる Viability 抑制効果に大きく寄与するものであると考えられる。

第三節 小括

各種アミノ酸を基質 (input) として添加し、その後細胞外に放出されるアミノ酸量を正常細胞 (NHBE) とがん細胞 (A549) で比較することで Gln -> Asn、Gln -> Ser という二つの代謝経路が A549 細胞で亢進していることが分かり、特に Gln -> Asn 代謝経路は複数種のがん細胞においても L-Gln の有無で L-Asn の産生量が大きく変化することから、Gln -> Asn は複数のがん種で亢進している代謝経路であると考えられた。

この Gln -> Asn 代謝経路に対して POS 系を構築することにより、生細胞系でこの代謝経路を阻害する新規阻害剤の取得に成功した。これら阻害剤は L-Gln のみが栄養源として供給される条件下において A549 細胞で特に Viability を強く抑制していることが示され、特に Benzethonium chloride は通常培養条件で 2-DG と併用することで A549 に対して特に強く細胞増殖抑制効果を示した。さらにキナーゼ阻害剤である Regorafenib は GLS を阻害することが強く示唆され、GLS 活性を制御するシグナル経路を阻害することで Gln -> Asn 代謝経路の活性が抑制されたということが予想される。詳しい阻害メカニズムについては今後の検討課題である。

得られた阻害剤は異なる標的を阻害していることが示唆され、本研究によって Gln -> Asn 代謝経路を構成する複数の酵素に対して生細胞レベルで有効な阻害剤を取得したことに成功したと言える。

第五章 総括と今後の展望

第五章 総括と今後の展望

第一節 総括

生細胞系で活性評価が困難な酵素に対して、これら酵素活性を生細胞レベルで阻害する化合物を探索する新たな生細胞ベースの high throughput screening 系である、Pathway-Oriented Screening (POS) 法を開発した。がんの特徴的な代謝経路に対して阻害剤を探索することにより、これまでに知見のない、生細胞レベルで有効な新規 MG 代謝系阻害剤・Gln → Asn 阻害剤を見出し、これら阻害剤はがん細胞で特に強い増殖抑制効果を示したことから、新たな代謝活性制御型の抗がん剤候補化合物としての発展が期待される。

生体内小分子を代謝する酵素について、カップルドアッセイを用いることで精製酵素を用いた *in vitro* での high throughput screening は可能と考えられるが、生体内でこれら酵素が複雑に制御されていることから、本研究で開発した POS 法という生細胞ベースで代謝活性を評価する high throughput screening 系は、今後有用なツールとなると考えられる。創薬プロセスのうち、基礎研究部分におけるアカデミア研究の貢献は大きく、このうち high throughput screening 系の技術開発やリード化合物の探索に対する貢献という観点から本研究の意義は深いと考えられ、今後大規模化合物ライブラリーを用いた POS 法による薬剤開発への貢献が期待される。

本研究で開発した細胞外代謝物を選択的に検出する新規蛍光プローブについて、これらは細胞から放出された代謝物を *in situ* で検出可能であることから、細胞のある代謝活性をリアルタイムで評価することができるという利点を有し、阻害剤スクリーニング以外にも応用できる可能性を秘めている。

POS 法は基質 (input) 添加後に代謝されて細胞外に放出された代謝物 (output) を検出することで input と output の間に介在する代謝経路の活性を評価するため、標的代謝経路を構成する酵素それぞれを標的として阻害剤スクリーニングを行うことが可能であり、実際に得られた Gln → Asn 代謝経路の複数の阻害剤は、細胞内アミノ酸量の変化からそれぞれ異なる標的を阻害していることが示唆された。

POS 法の汎用性について、系の性質上 input および output、細胞種を様々に選択可能であることからその汎用性の高さが期待される。実際に本研究では 2 つの代謝経路について POS 法による阻害剤スクリーニングを行い、新規阻害剤を取得した。Gln → Ser 代謝経路についても蛍光プローブによる活性評価が可能であることを確認しており、これについても将来的にはその阻害剤の取得が可能と考えられる。さらに適用可能な細胞種について、MG 代謝系に関して 10 種類以上の正常細胞・がん細胞における活性を開発した蛍光プローブにより評価可能であったことから、適用可能な細胞種は多いことが推察される。このように複数の代謝経路・細胞種に対して適用可能であったことから、POS 法は汎用性の高いアッセイ系であると考えられる。

また、POS 法は基質のみしか存在しない条件でアッセイを行うため、実際の細胞培養条件とは異なる。従って、生細胞を用いているが、他の基質が存在する通常培養条件では得られた阻害剤の標的代謝経路に対する阻害能は異なることが考えられるため、スクリーニングでの条件と通常培養条件との乖離については考慮する必要があることは今後の課題である。しかし、これは裏を返せば、栄養条件を限定した環境では確実に標的代謝経路を阻害するため、例えば抗がん剤の併用という点で得られる代謝活性阻害剤を発展させることが期待される。

第二節 今後の展望

POS 法は input・output は様々に選択可能で様々な代謝活性を生細胞レベルで評価可能であり、用いる細胞に遺伝子操作などの特別な処理は必要ないことから、がんを含め様々な疾患について代謝活性を評価可能でこれを制御する化合物を探索できると期待される。

様々な細胞種に利用可能という点について、今後は例えば希少がんの代謝活性を評価し、その阻害剤を取得することが考えられる。希少がんは「新規に診断される症例の数が 10 万人あたり年間 6 例未満のがん」と発症数により定義されるがんである⁴⁴。希少がんの治療の課題は主に症例数が少ないことに起因し、その課題の 1 つに希少がんの知見が少なく診断や治療法の確立が困難という点が存在する⁴⁵。POS 法を希少がんに適用することで、代謝活性という観点から個々の希少がんの特徴を捉え、抗がん候補化合物の探索が可能であると考えられる。例えばアミノ酸代謝系阻害剤の探索の研究（第四章）で触れたように、各希少がんについて input と output の組み合わせを探索することで代謝活性の特徴を知り、これを基に適用可能な既存薬の探索や POS を行うことによる新規抗がん剤候補化合物の探索が可能になると期待される。

さらに、POS 法は生細胞の様々な代謝活性を評価可能という点について、第四章で述べた Gln → Ser 代謝経路や、あるいは解糖系・アミノ酸代謝と同様にがんの治療標的とされる脂質代謝系⁴⁻⁶に対しても POS 法を用いた阻害剤探索を行うことで新規抗がん剤候補化合物を取得し、がん治療に貢献することが期待される。

実験の部

Methods

Materials. General chemicals were of the best grade available, supplied by Tokyo Chemical Industries, Wako Pure Chemical, Sigma-Aldrich, and were used without further purification. All solvents were used after appropriate distillation or purification. Silica gel column chromatography was performed with silica gel 60 (Spherical) (Kanto Chemical Co.) or silica gel 60 N (Spherical, neutral) (Kanto Chemical Co.). D-lactate dehydrogenase was purchased from TOYOBO.

Instruments. NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-LA400 instrument at 400 MHz for ^1H NMR and 100 MHz for ^{13}C NMR, or ECZ400S instrument at 400 MHz for ^1H NMR and at 100 MHz for ^{13}C NMR. δ values are in ppm relative to tetramethylsilane. Mass spectra (MS) were measured with a JEOL JMS-T100LC AccuToF for ESI. Preparative HPLC was performed on an Inertsil ODS-3 (10 \times 250 mm) column (GL Sciences Inc.) using an HPLC system composed of a pump (PU-2080, JASCO) and a detector (MD-2015 or FP-2025, JASCO). Preparative MPLC was performed on a silica gel column (silica gel 40 μm or Amino 40 μm , Yamazen) using an MPLC system composed of a pump and

detector (EPCLC AI-580S, Yamazen) or (Biotage). LC-MS analysis was performed on an Astec CHIROBIOTIC (25 cm × 2.1 mm, 5 μm) column (sigma aldrich) using an LC-MS system composed of a pump (1260 Bin Pump, Agilent Technologies), PDA detector (1260DAD, Agilent Technologies) and MS detector (6130 Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies). UPLC-MS/MS analysis was performed on an Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm (2.1 × 50 mm) column (Waters) using a UPLC system Acquity UPLC H-Class, Waters) and MS/MS detector (Xevo TQD, Waters).

UV-Vis Absorption and fluorometric Analysis. UV-Visible spectra were obtained on a Shimadzu UV-1650. Fluorescence spectroscopic studies were performed on a Hitachi F-7100. The slit width was 5.0 nm for both excitation and emission. The photomultiplier voltage was 400 V. Relative fluorescence quantum yields were obtained by comparing the area under the emission spectrum of the test sample, such as coumarin derivatives (SQC and sulfoC). SQC and sulfoC were excited at 350 nm in PBS solution (pH 7.4). Quinine sulfate was excited at 350 nm in 0.1 M H₂SO₄ aq., which has a quantum yield of 0.55⁴⁶.

For determination of the fluorescence quantum yield of APsF and sulfoF, APsF and sulfoF were excited at 490 nm in PBS solution (pH 7.4), and fluorescein were excited at 490 nm in 0.1 N NaOH aq., which has a quantum yield of 0.85⁴⁷.

Preparation of cells.

H226, H522, DMS114 and DMS273 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI medium 1640 (1×), Gibco 11875-093), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Gibco, 15410-122).

A549, HepG2, MIAPaCa2, HT29 and HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM medium (1×), Gibco 11885-084), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Gibco, 15410-122).

NHBE cells were cultured in Bronchial Epithelial Cell Basal medium (BEBM, Lonza CC-3170), supplemented with Bronchial Epithelial Cell Growth Medium SingleQuots™ Supplements and Growth Factors (BEGM, Lonza, CC-4175).

HCoEpic cells were cultured in Colonic Epithelial Cell Medium (CoEpiCM, ScienCell, #2951), supplemented with Colonic Epithelial Cell Growth Supplement (CoEpiCGS, ScienCell, #2952).

HUVEC cells were cultured in Endothelial Cell Basal Medium-2 (EBMTM-2, Lonza CC-3156), supplemented with EGMTM-2 SingleQuotsTM Supplements (Lonza, CC-4176).

All cells were cultured in a humidified incubator under 5% CO₂ in 95% air.

Measurement of NADH in *in vitro* assay.

Fluorescence (Ex/Em = 355/460 nm) was measured by microplate reader (Envision) 20 min after mixing probe solution and NADH solution at 37 °C. SQC (1 μM), DT-diaphorase (1 U/mL) and NADH (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM) were used. The reaction buffer was Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, pH 7.4).

Measurement of H₂O₂ in *in vitro* assay.

Fluorescence (Ex/Em = 485/535 nm) was measured by microplate reader (Envision) 20 min after mixing probe solution and H₂O₂ solution at 37 °C.

APsF (10 μM), Horseradish peroxidase (1 U/mL) and H_2O_2 (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, μM) were used. The reaction buffer was Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, pH 7.4).

Measurement of L-lactate in *in vitro* assay.

Fluorescence (Ex/Em = 355/460 nm) was measured with a microplate reader (Envision) 20 min after mixing probe solution and L-lactate solution at 37 °C. SQC (2 μM), DT-diaphorase (2 U/mL), L-lactate dehydrogenase (2 $\mu\text{g/mL}$), NAD^+ (200 μM) and L-lactate (0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM) were used. The reaction buffer was DPBS (pH 7.4).

Measurement of D-glucose in *in vitro* assay.

Fluorescence (Ex/Em = 485/535 nm) was measured with a microplate reader (Envision) 20 min after mixing probe solution and L-lactate solution at 37 °C. APsF (10 μM), glucose oxidase (0.25 mg/mL), Horseradish peroxidase (1 U/mL), FAD (5 μM) and D-glucose (0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM) were used. The reaction buffer was DPBS (pH 7.4).

Measurement of L-lactate in extracellular media.

DMS273 cells were seeded at 2×10^3 cells per well in 100 μ M L-lactate in DPBS (pH 7.4) and then probe solution was added to the medium.

Fluorescence (Ex/Em = 355/460 nm) was measured with a microplate reader (Envision) 20 min after addition of probe solution at 37 °C.

SQC (2 μ M) or Resazurin (50 μ M), DT-diaphorase (0 or 20 μ g/mL), L-lactate dehydrogenase (0 or 2 μ g/mL), NAD⁺ (200 μ M) in DPBS (pH 7.4) were used.

Measurement of D-glucose in extracellular media.

A549 cells were seeded at 2×10^3 cells per well in 10 μ M D-glucose in DPBS (pH 7.4) and then probe solution was added to the medium. Fluorescence (Ex/Em = 485/535 nm) was measured with a microplate reader (Envision) 20 min after addition of probe solution at 37 °C.

APsF (10 μ M), glucose oxidase (0.05 mg/mL), Horseradish peroxidase (0.1 U/mL), FAD (5 μ M) in DPBS (pH 7.4) were used.

CCK8 assay (cytotoxicity assay).

Cells were seeded at 5×10^3 cells per well in culture medium on 96-well plates. After 48 hr incubation at 37°C, CCK8 assay kit solution (Dojindo, 343-07623) was added. After 1- 4 hr incubation at 37°C, the absorbance at 450 nm was measured with a plate reader (Envision).

Measurement of Methylglyoxal metabolic activity of cells

Cells were seeded at 2×10^3 cells per well in 100 μ M methylglyoxal in DPBS (pH 7.4) with or without BBGCD (50 μ M). After incubation for 1 hr at 37 °C, probe solution was added to the medium. Fluorescence (Ex/Em = 355/460 nm) was measured with a microplate reader (Envision) 20 min after addition of probe solution at 37 °C.

SQC (2 μ M), DT-diaphorase (2 U/mL), D-lactate dehydrogenase (0 or 2 U/mL), NAD⁺ (200 μ M) in DPBS (pH 7.4) were used.

Methylglyoxal metabolic pathway inhibitor screening.

1st screening.

High-throughput screening (HTS) was performed against a chemical library of 9,600 compounds at the Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo.

First, test compounds (50 nL of 2 mM DMSO stock solution) were placed in wells of a multiwell plate (Corning No. 3677) using a POD Automation Platform (Labcyte). Then, 10 μ L of DMS114 cells (4×10^5 cells/mL) in 100 μ M MG in DPBS (pH 7.4) was added to all wells using a Multi-Drop combi (Thermo Fischer Scientific). After incubation at r.t. for 2 hr, 10 μ L probe solution (SQC (2 μ M), DT-diaphorase (2 U/mL), D-Lactate dehydrogenase (2 U/mL), NAD⁺ (200 μ M) in DPBS (pH 7.4)) was dispensed into the wells, and the plates were incubated at r.t. for 30 min. The fluorescence intensity of SQC was measured (Ex/Em = 380/490 nm) using a microplate reader (PHERAster, BMG LABTECH). Negative or positive control wells (i.e., including 100 or 0 μ M MG, n = 16) were also prepared for all plates.

2nd screening.

2nd screening was performed against 583 compounds that showed high inhibition (cutoff = 50%). The confirmation assay was performed in the same way as in the 1st screening, but the inhibitory effect was tested in two independent experiments. Inhibition was also examined under cell-free conditions. A 10 μ L aliquot of 5 μ M D-lactate and 100 μ M MG in DPBS (pH 7.4) was injected to all wells containing hit compounds using Multi-Drop combi (Thermo Fischer Scientific). After incubation at r.t. for 2 hr, 10 μ L/well of probe solution was dispensed, and incubation was continued at r.t. for 30 min. The fluorescence intensity of SQC was measured (Ex/Em = 380/490 nm) using a microplate reader (PHERAster, BMG LABTECH). Negative or positive control wells. Negative or positive control wells (i.e., including 5 or 0 μ M D-lactate, n = 16) were also prepared for all plates.

3rd screening.

3rd screening was performed against 21 compounds that showed high inhibition (cutoff = A, A > 30 %) in confirmation assay, and did not inhibit the assay system itself (cutoff = B, A > B). NHBE or DMS114 cells were seeded at

5 × 10³ cells per well (96 well plate) in culture medium with/without inhibitor (0.3, 1 or 10 μM test compound, n = 3 for each). After 48 hr incubation at 37°C, CCK-8 assay was performed. Absorbance at 450 nm was measured by microplate reader (Envision). Two compounds that showed stronger cell growth inhibitory activity toward DMS114 cells at 10 μM than that toward NHBE cells were selected as hits.

4th screening.

4th screening was performed against 29 compounds that are derivatives of two hit compounds at 3rd screening.

Evaluation of the inhibitory activity of each test compound toward MG metabolic pathway was performed by LC-MS. DMS114 or DMS273 cells were seeded at 4 × 10⁵ cells per tube in 100 μM MG and test compounds (10 μM) in DPBS (pH 7.4) (n = 3). After 2 hr incubation at 37°C, the sample was centrifuged and supernatant was collected. The supernatant was analyzed by LC-MS (Agilent Technologies).

Evaluation of the cell growth inhibitory activity of each test compound was performed by CCK-8 assay. NHBE, DMS114 or DMS273 cells were seeded at 5

$\times 10^3$ cells per well (96 well plate) in culture medium with test compounds (0, 0.05, 0.5 or 5 μM , $n = 3$) and incubated for 48 hr at 37°C. Seven compounds that showed inhibitory activity toward MG metabolic pathway of DMS114 or DMS273 cells and had stronger inhibitory activity toward cell growth of DMS273 cells at 5 μM than that of NHBE cells were selected as hits.

Measurement of metabolites of methylglyoxal metabolic pathway after treatment of hit compound 1.

DMS273 cells were seeded at 4×10^5 cells per tube in 100 μM MG and hit compound 1 (0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) ($n = 4$). After 2 hr incubation at 37°C, sample was centrifuged and supernatant was collected. Extracellular D-lactate was measured by analysis of the supernatant with SQC probe. After collection of supernatant, the cells were washed with DPBS (pH 7.4) and lysed by vortexing with MeOH/H₂O (80/20, v/v). The lysate was centrifuged and supernatant was collected. Intracellular S-D-lactoylglutathione was measured by analysis of the cell extract with LC-MS/MS (Waters). For detection of intracellular GSH, the cell extract (15 μL) was mixed with 15 μL 5 mM Dansyl-Cl in MeCN and 15 μL 100 mM borate buffer (pH 9.1) at r.t. for 30 min, then

quenched by adding 15 μ L MeCN containing 10% formic acid. The mixture was subjected to UPLC-MS/MS. Detection was performed in the positive mode. For S-D-lactoylglutathione, the fragment of $m/z = 380.1 > 233.1$ was used (cone voltage: 20 V, collision voltage: 20 V), for GSH, the fragment $m/z = 541.2 > 170.1$ was used (cone voltage: 45 V, collision voltage: 40 V).

Evaluation of the inhibitory activity of hit compound 1 toward methylglyoxal metabolic activity in *in cellulo*.

DMS273 or NHBE cells were seeded at 2×10^3 cells per well (384 well plate) in 100 μ M MG and hit compound 1 (0-30 μ M) in DPBS (pH 7.4) ($n = 4$). After 2 hr incubation at 37°C, probe solution was added to the medium.

Fluorescence (Ex/Em = 355/460 nm) was measured with a microplate reader (Envision) 20 min after addition of probe solution at 37 °C.

SQC (2 μ M), DT-diaphorase (20 μ g/mL), D-lactate dehydrogenase (2 U/mL), NAD⁺ (200 μ M) in DPBS (pH 7.4) were used.

Evaluation of the inhibitory activity of hit compound 1 toward cell growth.

NHBE or DMS114 cells were seeded at 5×10^3 cells per well (96 well plate) in culture medium with hit compound 1 (0-50 μM , $n = 6$). After 48 hr incubation at 37°C, CCK-8 assay was performed.

Evaluation of the inhibitory activity of hit compound 1 toward GLO1 activity in *in vitro*.

GSH (1 mM), MG (100 μM) and hit compound 1 (10 μM) were mixed for 15 min at r.t. and GLO1 enzyme (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added. After 5 min incubation at r.t., the mixture was quenched by MeOH and measured by UPLC-MS/MS (Waters). Detection was performed in the positive mode. For S-D-lactoylglutathione, the fragment of $m/z = 380.1 > 233.1$ was used (cone voltage: 20 V, collision voltage: 20 V).

Measurement of extracellular metabolites by UPLC-MS/MS

(input/output screening).

A549 or NHBE cells were seeded at 1.2×10^4 cells in a 96-well plate and incubated with each input metabolites in DPBS (pH 7.4) at 37°C for 4 hr. After incubation, extracellular medium 30 μ L was recovered and mixed with 30 μ L 5 mM Dansyl-Cl in MeCN and 30 μ L 100 mM borate buffer (pH 9.1) at r.t. for 30 min, then quenched by adding 30 μ L MeCN containing 10% formic acid. The mixture was subjected to UPLC-MS/MS.

Measurement of extracellular metabolites by UPLC-MS/MS (¹³C-labeled amino acid input/output).

A549 cells were seeded at 1.2×10^4 cells in a 96-well plate and incubated with 1 mM L-glutamine or ¹³C₅ L-glutamine in DPBS (pH 7.4) at 37°C for 4 hr. After incubation, extracellular medium 30 μ L was recovered and mixed with 30 μ L 5 mM Dansyl-Cl in MeCN and 30 μ L 100 mM borate buffer (pH 9.1) at r.t. for 30 min, then quenched by adding 30 μ L MeCN containing 10% formic acid. The mixture was subjected to UPLC-MS/MS. Detection was performed in the positive mode. For Asn, the fragment of $m/z = 366.2 > 170.1$ was used, for

Asn (m+1), the fragment $m/z = 367.2 > 170.1$ was used, for Asn (m+2), the fragment $m/z = 368.2 > 170.1$ was used, for Asn (m+3), the fragment $m/z = 369.2 > 170.1$ was used, for Asn (m+4), the fragment $m/z = 370.2 > 170.1$ was used (cone voltage: 25 V, collision voltage: 25 V).

Gln -> Asn metabolic pathway inhibitor screening.

1st screening.

High-throughput screening (HTS) was performed against a chemical library of 1,600 compounds at the Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo. First, test compounds (50 nL of 2 mM DMSO stock solution) were placed in wells of a multiwell plate (Corning No. 3677) using a POD Automation Platform (Labcyte). Then, 10 μ L of A549 cells (2×10^5 cells/mL) in 2 mM L-glutamine in DPBS (pH 7.4) was added to all wells using a Multi-Drop combi (Thermo Fischer Scientific). After incubation at 37°C for 4 hr, 10 μ L probe solution (APsF (10 μ M), enzyme solution (diluted to 1/100, Asn detection kit, BIOVISION)) was dispensed into the wells, and the plates were incubated at 37°C for 1 hr. The fluorescence intensity of APsF was measured (Ex/Em = 485/535 nm) using a microplate reader (Envision). Negative or positive

control wells (i.e., including 2 or 0 mM L-glutamine, n = 16) were also prepared for all plates.

2nd screening.

2nd screening was performed against 271 compounds that showed high inhibition (cutoff = 50%). The confirmation assay was performed in the same way as in the 1st screening, but the inhibitory effect was tested in four independent experiments. Inhibition was also examined under cell-free conditions. A 10 μ L aliquot of 9 μ M L-Asparagine and 2 mM L-glutamine in DPBS (pH 7.4) was injected to all wells containing hit compounds using Multi-Drop combi (Thermo Fischer Scientific). After incubation at 37°C for 4 hr, 10 μ L/well of probe solution was dispensed, and incubation was continued at 37°C for 1 hr. The fluorescence intensity of APsF was measured (Ex/Em = 485/535 nm) using a microplate reader (Envision). Negative or positive control wells (i.e., including 9 or 1 μ M L-Asparagine, n = 16) were also prepared for all plates.

3rd screening.

3rd screening was performed against 42 compounds that showed high inhibition (cutoff = A, A > 80%) in confirmation assay, and did not inhibit the assay system itself (cutoff = B, B < 10%). Evaluation of the inhibitory activity of each test compound toward Gln → Asn metabolic pathway was performed by UPLC-MS/MS. A549 cells were seeded at 4×10^4 cells per well (96 well plate) in 2 mM L-glucose in DPBS (pH 7.4) with test compounds (0, 0.3, 1, 10 μ M, n = 3 for each). After 4 hr incubation at 37°C, sample was centrifuged and supernatant was collected. Supernatant (15 μ L) was mixed with 15 μ L 5 mM Dansyl-Cl in MeCN and 15 μ L 100 mM borate buffer (pH 9.1) at r.t. for 30 min, then quenched by adding 15 μ L MeCN containing 10% formic acid. The mixture was subjected to UPLC-MS/MS. Detection was performed in the positive mode. For L-Asparagine, the fragment of $m/z = 366.2 > 170.1$ was used (cone voltage: 25 V, collision voltage: 25 V).

Evaluation of the inhibitory activity of each test compound toward cell growth was performed by CCK-8 assay. A549 cells were seeded at 5×10^3 cells per well (96 well plate) in culture medium with test compounds (0, 0.3, 1, 10 μ M, n = 3 for each). After 48 hr incubation at 37°C, CCK-8 assay was performed.

Five compounds that showed consistently strong inhibitory activity at 10 μ M toward both Gln \rightarrow Asn metabolic pathway and cell growth were selected as hits.

Identification of the target enzymes of hit compounds.

A549 cells were seeded at 7.5×10^5 cells in a tube and incubated with 2 mM L $^{13}\text{C}_5$ L-glutamine in DPBS (pH 7.4) with hit compounds (Niclosamide, Benzethonium chloride or Regorafenib, 0 or 10 μ M) at 37°C for 2 hr. After incubation, sample was centrifuged and supernatant was collected. After collection of supernatant, the cells were washed with DPBS (pH 7.4) and lysed by vortexing with MeOH/H₂O (80/20, v/v). The lysate was centrifuged and supernatant was collected. Intracellular ^{13}C -labeled amino acids were measured by analysis of the cell extract with LC-MS/MS (Waters). The cell extract (15 μ L) was mixed with 15 μ L 5 mM Dansyl-Cl in MeCN and 15 μ L 100 mM borate buffer (pH 9.1) at r.t. for 30 min, then quenched by adding 15 μ L MeCN containing 10% formic acid. The mixture was subjected to UPLC-MS/MS. Detection was performed in the positive mode. For $^{13}\text{C}_5$ L-Gln, the fragment of $m/z = 385.2 > 170.1$ was used (cone voltage: 35 V, collision

voltage: 30 V), for $^{13}\text{C}_5$ L-Glu, the fragment $m/z = 386.1 > 170.1$ was used (cone voltage: 45 V, collision voltage: 20 V). for $^{13}\text{C}_4$ L-Asp, the fragment $m/z = 371.2 > 157.1$ was used (cone voltage: 30 V, collision voltage: 40 V). for $^{13}\text{C}_4$ L-Asn, the fragment $m/z = 370.2 > 170.1$ was used (cone voltage: 25 V, collision voltage: 25 V).

Evaluation of the inhibitory activity of hit compounds toward Gln -> Asn metabolic activity in *in cellulo*.

A549 cells were seeded at 7.5×10^5 cells per tube in 2 mM L-glutamine and hit compounds (Niclosamide, Benzethonium Chloride or Regorafenib 0 or 10 μM) in DPBS (pH 7.4) ($n = 4$). After 2 hr incubation at 37°C , sample was centrifuged and supernatant was collected. After collection of supernatant, the cells were washed with DPBS (pH 7.4) and lysed by vortexing with MeOH/ H_2O (80/20, v/v). The lysate was centrifuged and supernatant was collected.

Intracellular amino acids were measured by analysis of the cell extract with LC-MS/MS (Waters). The cell extract (15 μL) was mixed with 15 μL 5 mM Dansyl-Cl in MeCN and 15 μL 100 mM borate buffer (pH 9.1) at r.t. for 30 min, then quenched by adding 15 μL MeCN containing 10% formic acid. The

mixture was subjected to UPLC-MS/MS. Detection was performed in the positive mode. For L-Gln, the fragment of $m/z = 380.2 > 170.1$ was used (cone voltage: 35 V, collision voltage: 30 V), for L-Glu, the fragment $m/z = 381.1 > 170.1$ was used (cone voltage: 45 V, collision voltage: 20 V). for L-Asp, the fragment $m/z = 367.2 > 157.1$ was used (cone voltage: 30 V, collision voltage: 40 V). for L-Asn, the fragment $m/z = 366.2 > 170.1$ was used (cone voltage: 25 V, collision voltage: 25 V). For detection of intracellular ATP, sample was mixed with CellTiterGlo2.0 solution (Thermofisher) and the luminescence intensity was measured by microplate reader (Envision).

Evaluation of the inhibitory activity of Benzethonium Chloride toward cell growth in the presence of 2-DG.

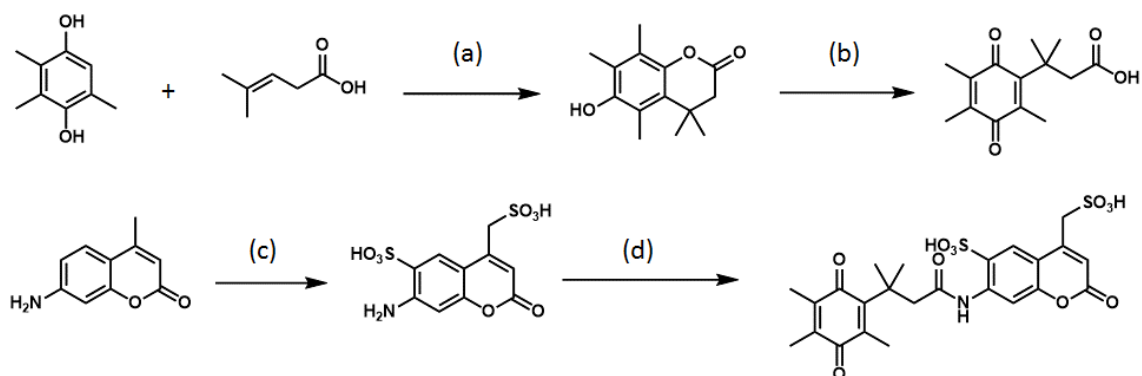
NHBE or A549 cells were seeded at 5×10^3 cells per well (96 well plate) in culture medium with Benzethonium chloride (0-30 μM $n = 6$) and 2-DG (0 or 20 mM). After 48 hr incubation at 37°C, CCK-8 assay was performed.

Evaluation of the inhibitory activity of hit compounds toward cell

viability.

NHBE or A549 cells were seeded at 2×10^3 cells per well (384 well plate) in 2 mM L-glutamine in DPBS (pH 7.4) with hit compounds (0, 10 or 30 μ M n = 16). After 2 hr incubation at 37°C, Calcein-AM solution was added and incubated for 30 min at 37°C and the fluorescence intensity (Ex./Em. = 485/535 nm) was measured by microplate reader (Envision).

Synthesis of a novel NADH detection fluorescent probe (SQC).

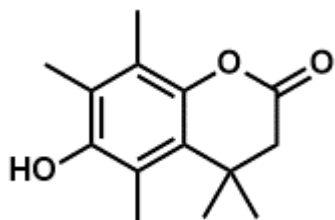


(a) MeSO_3H , 85 °C, Yield: quant. (b) NBS, MeCN/ H_2O , r.t., Yield: 76.7 % (c)

ClSO_3H , 0 °C \rightarrow 120 °C, Yield: 13.5 % (d) 1,4-Cyclohexadiene-1-propanoic acid,

HATU, DIEA, r.t., Yield: 6.1 %.

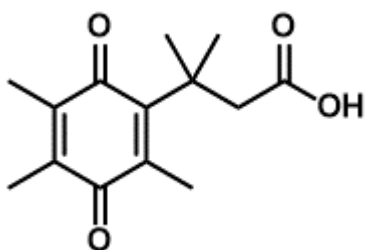
Preparation of compound 1



Trimethylhydroquinone (3.04 g, 20.0 mmol) and 3-Methylcrotonic acid (2.20 g, 22.0 mmol) was dissolved in MeSO_3H (15 mL), and the solution was stirred at 85°C for 6 hr under Ar. Then, the mixture was cooled to r.t. and extracted with AcOEt and washed with sat. $\text{NaHCO}_3\text{aq.}$. The organic layer was evaporated to dryness and pumped up to afford 1 (4.70 g, 20.1 mmol, quant yield). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.44 (s, 6H), 2.17 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.53

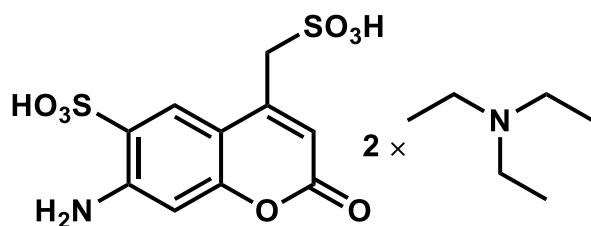
(s, 2H), 4.73 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 12.4, 12.7, 14.6, 26.7, 27.8, 35.6, 46.2, 119.0, 121.9, 123.5, 128.3, 143.6, 148.9, 169.0. HRMS (ESI^+): Calcd. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 235.13342, Found 235.13197 (-1.45 mmu).

Preparation of compound 2



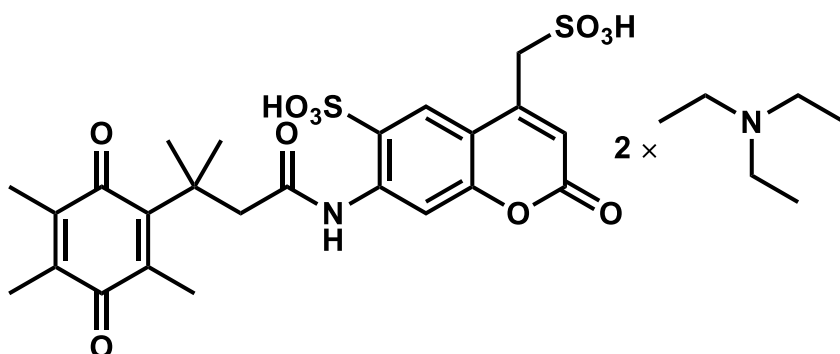
Compound 1 (4.70 g, 20.1 mmol) was dissolved in MeCN/ H_2O (6/12 mL), and then NBS (3.86 g, 21.7 mmol) was added. The mixture was stirred at r.t. for 2 hr, then the mixture was extracted with AcOEt/2 N HCl aq. and evaporated to dryness. The residue was purified by MPLC (silica, eluent, 50% CH_2Cl_2 /hexane (0 min) to 100% CH_2Cl_2 /hexane (9 min)) to afford 2 (3.86 g, 15.4 mmol, 76.7 % yield). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.33 (s, 6H), 1.82 (s, 6H), 1.85 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.91 (s, 2H), 10.94 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 12.1, 12.5, 14.3, 28.8, 37.9, 47.3, 138.3, 139.0, 143.0, 152.1, 178.7, 187.4, 190.8. HRMS (ESI^-): Calcd. for $[\text{M}-\text{H}]^-$ 249.11268, Found 249.10864 (-4.05 mmu).

Preparation of compound 3



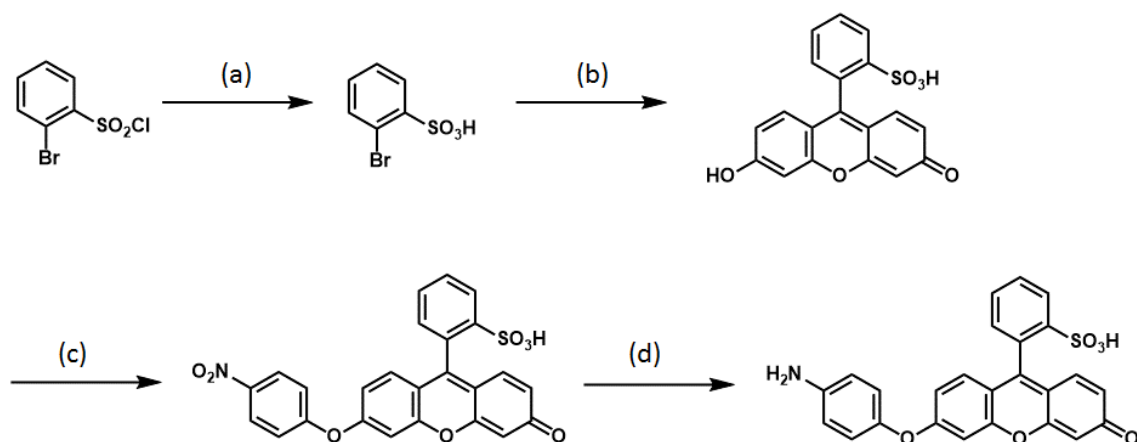
ClSO₃H (2 mL) was added slowly to 7-amino-4-methylcoumarin (554 mg, 3.16 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred at 120 °C for 4 hr. The mixture was cooled to 0 °C and quenched with H₂O and neutralized with 2 N NaOH aq. and evaporated to dryness. The residue was purified by HPLC (eluent, 4% CH₃CN/0.1% TEAA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TEAA aq. (25 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford 3 (230 mg, 0.43 mmol, 13.5 % yield). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.19 (s, 2H), 6.18, (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 8.20 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 52.5, 100.9, 108.2, 111.4, 125.5, 126.4, 149.3, 149.4, 156.5, 162.0 HRMS (ESI⁻): Calcd. for [M-H]⁻ 333.96913, Found 333.96614 (-2.99 mmu).

Preparation of compound 4



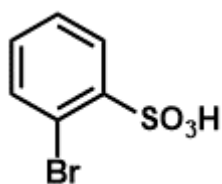
Compound 3 (54 mg, 0.10 mmol), compound 2 (73.5 mg, 0.29 mmol), HATU (108 mg, 0.28 mmol) and DIEA (81 μ L, 0.47 mmol) were dissolved in MeCN (1 mL). The mixture was stirred at r.t. for 16 hr, and evaporated to dryness. The residue was purified by HPLC (eluent, 4% CH₃CN/0.1% TEAA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TEAA aq. (25 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford 4 (4.70 mg, 0.0061 mmol, 6.1 % yield). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.48 (s, 6H), 1.95-1.96 (m, 6H), 2.11 (s, 3H), 3.12 (s, 2H), 4.28 (s, 2H), 6.49 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.42 (s, 1H). HRMS (ESI⁻): Calcd. for [M+Na-H]⁻ 588.06102, Found 588.06169 (+0.67 mmu). .

Synthesis of a novel H₂O₂ detection fluorescent probe (APsF).



(a) Acetone/H₂O, 50 °C, Yield: 49.8 % (b) i) *sec*-BuLi, THF, -78 °C ii) DiTBS Xanthone, THF, -78 °C → r.t. iii) 2 N HCl aq., r.t., Yield: 32.5 % (in 3 steps) (c) *p*-fluoronitrobenzene, K₂CO₃, MeCN/DMF, 180 °C, Yield: 49.1 % (d) Pd/C, H₂, MeOH/CH₂Cl₂, r.t., Yield: 30.5 %.

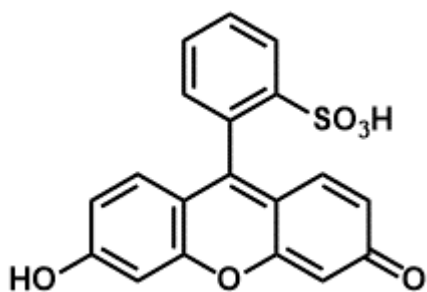
Preparation of compound **5**



2-Bromobenzenesulfonyl Chloride (4.09 g, 16.0 mmol) was dissolved in acetone/H₂O (16/8 mL), and the solution was stirred at 50 °C for 6 hr. The mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by HPLC (eluent, 4% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TFA aq. (25 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford **5** (1.89 g, 7.97 mmol, 49.8 % yield). ¹H NMR

(400 MHz, CD₃OD): δ 7.62-7.64 (m, 2H), 7.91-7.93 (m, 1H), 8.17-8.19 (m, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CF₃COOD): δ 119.8, 127.8, 130.3, 134.8, 135.6, 137.4. HRMS (ESI⁻): Calcd. for [M-H]⁻ 234.90645, Found 234.90747 (+1.02 mmu).

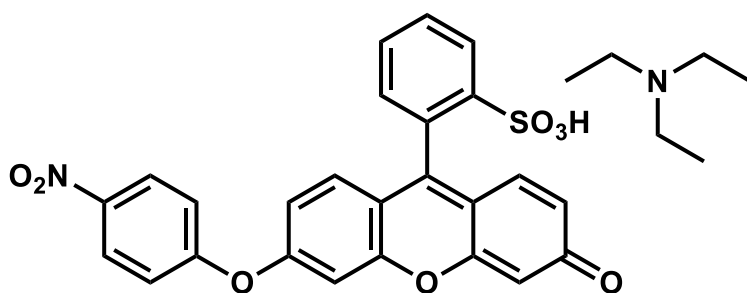
Preparation of compound 6



2-Bromo-benzene sulfonic acid (324 mg, 1.38 mmol) was dissolved in THF in a dry flask, and the solution was stirred at -78°C for 10 min under Ar. Then, 1 M *sec*-BuLi (2.76 mL, 2.76 mmol) was added slowly and the mixture was stirred at -78°C for 10 min under Ar. A solution of DiTBS-xanthone (161 mg, 0.35 mmol) in THF was added slowly and the mixture was stirred at r.t. for 1.5 hr under Ar. 2N HCl aq. was added and stirring was continued at r.t. for 20 min. The mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by HPLC (eluent, 4% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TFA aq. (25 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford 6 (42 mg, 0.11 mmol, 32.5 % yield).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 6.57-6.60 (m, 4H), 6.99 (dd, 2H, $J = 1.6, 8.8$ Hz), 7.22 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.60-7.68 (m, 2H), 8.17 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 102.7, 114.7, 121.3, 127.8, 129.2, 129.9, 130.1, 130.8, 132.1, 144.2, 155.7, 158.3, 177.4. HRMS (ESI): Calcd. for $[\text{M}-\text{H}]^-$ 367.02763, Found 367.02754 (-0.10 mmu).

Preparation of compound 7

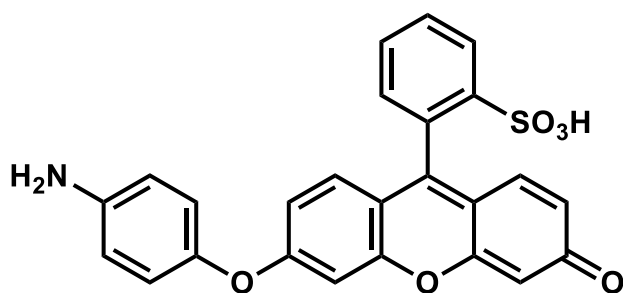


Compound 6 (15 mg, 0.041 mmol) was dissolved in MeCN/DMF (4/0.6 mL), and then 4-fluoronitrobenzene (22 μL , 0.21 mmol) and K_2CO_3 (11 mg, 0.08 mmol) were added. The mixture was stirred at 180 $^\circ\text{C}$ for 40 min with microwave, then cooled to r.t., and evaporated to dryness. The residue was purified by HPLC (eluent, 4% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TEAA aq. (0 min) to 80% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TEAA aq. (25 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford 7 (12 mg, 0.020 mmol, 49.1 % yield).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 6.41 (t, 1H, $J = 0.8$ Hz), 6.53 (dd, 1H, $J = 2.0,$

9.6 Hz), 7.00 (dd, 1H, $J = 2.4, 8.8$ Hz), 7.09 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 7.18 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.26-7.32 (m, 4H), 7.63-7.71 (m, 2H), 8.17 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 8.30 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz). HRMS (ESI⁻): Calcd. for [M+H]⁺ 490.05966, Found 490.06237 (+2.71 mmu).

Preparation of compound 8



Compound 7 (12 mg, 0.024 mmol) was dissolved in MeOH/CH₂Cl₂ (3/3 mL), and then a catalytic amount of Pd/C was added. The mixture was stirred at r.t. for 30 min under H₂, and evaporated to dryness. The residue was purified by HPLC (eluent, 4% CH₃CN/0.1% TEAA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TEAA aq. (25 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford 8 (4.1 mg, 0.0073 mmol, 30.5 % yield). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.12 (dd, 1H, $J = 2.0, 9.2$ Hz), 7.18 (t, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.28 (dt, 1H, $J = 2.0, 9.2$ Hz), 7.34-7.39 (m, 4H), 7.45 (dd, 2H, $J = 2.0, 8.8$ Hz), 7.54 (dd, 1H, $J = 2.0, 9.2$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 2.0, 9.2$

Hz), 7.71 (t, 1H, J = 8.0), 7.79 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 8.21 (d, 1H, J = 8.0 Hz).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 102.1, 103.4, 118.0, 118.8, 118.9, 121.7, 122.2, 124.1, 127.9, 128.9, 129.3, 130.0, 130.6, 130.9, 133.9, 134.8, 144.5, 153.1, 157.7, 160.8, 166.7, 167.3, 175.3. HRMS (ESI⁻): Calcd. for [M+H]⁺ 460.08548, Found 460.08628 (+0.80 mmu).

参考文献

1. R. Macarron, M. N. Banks, D. Bojanic, D. J. Burns, D. A. Cirovic, T. Garyantes, D. V. S. Green, R. P. Hertzberg, W. P. Janzen, J. W. Paslay, U. Schopfer, G. S. Sittampalam, Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 188-195.
2. D. C. Swinney, J. Anthony, How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 507-519.
3. A. L. Hopkins, C. R. Groom, The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727-730.
4. U. E. Mariñenez-Outschoorn, M. Peiris-Pagés, R. G. Pestell, F. Sotgia, M. P. Lisanti, Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2017**, *14*, 11-31.
5. M. G. Vander Heiden, Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 671-684.
6. L. Galluzzi, O. Kepp, M. G. Vander Heiden, G. Kroemer, Metabolic targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2013**, *12*, 829-846.
7. A. Saghatelian, B. F. Cravatt, Assignment of protein function in the postgenomic era. *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 130-142.
8. T. Komatsu, Y. Urano, Chemical Toolbox for "Live" Biochemistry to Understand Enzymatic Functions in Living Systems. *J. Biochem.*, **2019**, *0*, 1-11.

9. G. Dong, Q. Mao, W. Xia, Y. Xu, J. Wang, L. Xu, F. Jiang, PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncology Letters*, **2016**, *11*, 1980-1986.
10. B. Chaneton, P. Hillmann, L. Zheng, A. C. L. Martin, O. D. K. Maddocks, A. Chokkathukalam, J. E. Coyle, A. Jankevics, F. P. Holding, K. H. Vousden, C. Frezza, M. O'Reilly, E. Gottlieb, Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*, **2012**, *491*, 458-462.
11. M. Kawaguchi, T. Okabe, S. Okudaira, K. Hanaoka, Y. Fujikawa, T. Terai, T. Komatsu, H. Kojima, J. Aoki, T. Nagano, Fluorescence Probe for Lysophospholipase C/NPP6 Activity and a Potent NPP6 Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 12021-12030.
12. M. N. Levine, R. T. Raines, Trimethyl lock: a trigger for molecular release in chemistry, biology, and pharmacology. *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 2412-2420.
13. K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H. J. Majima, T. Nagano, Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 3170-3175.
14. N. Rabbani, M. Xue, P. J. Thornalley, Activity, regulation, copy number and function in the glyoxalase system. *Biochem. Soc. Trans.*, **2014**, *42*, 419-424.
15. P. J. Thornalley, N. Rabbani, Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2011**, *22*, 318-325.

16. N. Rabbani, M. Xue, P. J. Thornalley, Methylglyoxal-induced dicarbonyl stress in aging and disease: first steps towards glyoxalase 1-based treatments. *Clin. Sci.*, **2016**, *130*, 1677-1696.
17. F. Hosoda, Y. Arai, N. Okada, H. Shimizu, M. Miyamoto, N. Kitagawa, H. Katai, H. Taniguchi, K. Yanagihara, I. Imoto, J. Inazawa, M. Ohki, T. Shibata, Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. *Oncogene*, **2015**, *34*, 1196-1206.
18. Hai-Tao Peng, J. Chen, Tian-Yu Liu, Yan-Qing Wu, Xiao-Hong Lin, Yuan-Hui Lai, Ying-Feng Huang, Up-regulation of the tumor promoter Glyoxalase-1 indicates poor prognosis in breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2017**, *10*, 10852-10862.
19. W. Bair, C. Cabello, K. Uchida, A. Bause, G. Wondrak, GLO1 overexpression in human malignant melanoma. *Melanoma Res.*, **2010**, *20*, 85-96.
20. S. Zhang, X. Liang, X. Zheng, H. Huang, X. Chen, K. Wu, B. Wang, S. Ma. Glo1 genetic amplification as a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2014**, *7*, 2079-2090.
21. H. Sakamoto, T. Mashima, S. Sato, Y. Hashimoto, T. Yamori, T. Tsuruo, Selective Activation of Apoptosis Program by S-p-bromobenzylglutathione Cyclopentyl Diester in Glyoxalase I-overexpressing Human Lung Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2513-2518.

22. H. Sakamoto, T. Mashima, A. Kizaki, S. Dan, Y. Hashimoto, M. Naito, T. Tsuruo, Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood*, **2000**, *95*, 3214-3218.
23. M. Takeuchi, S. Kimura, J. Kuroda, E. Ashihara, M. Kawatani, H. Osada, K. Umezawa, E. Yasui, M. Imoto, T. Tsuruo, A. Yokota, R. Tanaka, R. Nagao, T. Nakahata, Y. Fujiyama, T. Maekawa, Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death Differ.*, **2010**, *17*, 1211-1220.
24. B. Chiavarina, Marie-Julie Nokin, F. Durieux, E. Bianchi, A. Turtoi, O. Peulen, P. Peixoto, P. Irigaray, K. Uchida, D. Belpomme, P. Delvenne, V. Castronovo, A. Bellahcène, Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. *Oncotarget*, **2012**, *5*, 5472-5482.
25. Y. Wang, Y. Kuramitsu, T. Ueno, N. Suzuki, S. Yoshino, N. Iizuka, J. Akada, T. Kitagawa, M. Oka, K. Nakamura, Glyoxalase I (GLO1) is Up-regulated in Pancreatic Cancerous Tissues Compared with Related Non-cancerous Tissues. *Anticancer Res.*, **2012**, *32*, 3219-3222.
26. A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat. Rev. Cancer*, **2017**, *17*, 725-737.

27. W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **1974**, *249*, 7130-7139.
28. M. J. Lukey, W. P. Katt, R. A. Cerione, Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov. Today*, **2017**, *22*, 796–804.
29. J. Zhang, N. N. Pavlova, C. B. Thompson, Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J.*, **2017**, *36*, 1302-1315.
30. B. J. Altman, Z. E. Stine, C. V. Dang, From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **2016**, *16*, 619-634.
31. N. Vié, V. Copois, C. Bascoul-Molleivi, V. Denis, N. Bec, B. Robert, C. Fraslou, E. Conseiller, F. Molina, C. Larroque, P. Martineau, M. D. Rio, C. Gongora, Overexpression of phosphoserine aminotransferase PSAT1 stimulates cell growth and increases chemoresistance of colon cancer cells. *Mol. Cancer*, **2008**, *7*, 14.
32. W. C. Zhang, N. Shyh-Chang, H. Yang, A. Rai, S. Umashankar, S. Ma, B. S. Soh, L. L. Sun, B. C. Tai, M. E. Nga, K. K. Bhakoo, S. R. Jayapal, M. Nichane, Q. Yu, D. A. Ahmed, C. Tan, W. P. Sing, J. Tam, A. Thirugananam, M. S. Noghabi, Y. H. Pang, H. S. Ang, W. Mitchell, P. Robson, P. Kaldis, R. A. Soo, S. Swarup, E. H. Lim, B. Lim, Glycine Decarboxylase Activity Drives Non-Small Cell Lung Cancer Tumor-Initiating Cells and Tumorigenesis. *Cell*, **2012**, *148*, 259-272.

33. B. Zhang, J. Tornmalm, J. Widengren, H. Vakifahmetoglu-Norberg, E. Norberg, Characterization of the Role of the Malate Dehydrogenases to Lung Tumor Cell Survival. *J. Cancer*, **2017**, *8*, 2088-2096.
34. S. Atlante, A. Visintin, E. Marini, M. Savoia, C. Dianzani, M. Giorgis, D. Sürün, F. Maione, F. Schnütgen, A. Farsetti, A. M. Zeiher, M. Bertinaria, E. Giraud, F. Spallotta, C. Cencioni, C. Gaetano, α -ketoglutarate dehydrogenase inhibition counteracts breast cancer-associated lung metastasis. *Cell Death and Disease*, **2018**, *9*, 756.
35. C. Sakai, E. Tomitsuka, H. Esumi, S. Harada, K. Kita, Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, *1820*, 643-651.
36. R. Kumar, L. Coronel, B. Somalanka, A. Raju, O. A. Aning, O. An, Y. S. Ho, S. Chen, S. Y. Mak, P. Y. Hor, H. Yang, M. Lakshmanan, H. Itoh, S. Y. Tan, Y. K. Lim, A. P. C. Wong, S. H. Chew, T. H. Huynh, B. C. Goh, C. Y. Lim, V. Tergaonkar, C. F. Cheok, Mitochondrial uncoupling reveals a novel therapeutic opportunity for p53-defective cancers. *Nat. commun.*, **2018**, *9*, 3931.
37. D. Strumberg, B. Schulthesis, Regorafenib for cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2012**, *21*, 879-889.
38. L. Adnane, P. A. Trail, I. Taylor, S. M. Wilhelm, Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), a Dual-Action Inhibitor That Targets RAF/MEK/ERK Pathway in Tumor

Cells and Tyrosine Kinases VEGFR/PDGFR in Tumor Vasculature. *Methods*

Enzymol., **2006**, *407*, 597-612.

39. NIH National Cancer Institute (<https://www.cancer.gov/>)

40. Jae-Seon Lee, J. H. Kang, Seon-Hyeong Lee, Chang-Hun Lee, J. Son, Soo-Youl

Kim, Glutaminase 1 inhibition reduces thymidine synthesis in NSCLC. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun., **2016**, *477*, 374-382.

41. K. Thangavelua, C. Q. Pana, T. Karlbergc, G. Balajid, M. Uttamchandania, V.

Sureshd, H. Schülerc, B. C. Lowa, J. Sivaramana, Structural basis for the allosteric

inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation

by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

2012, *109*, 7705-7710.

42. Chun-Nan Yeh, Yu-Chan Chang, Y. Su, D. Shin-Shian Hsu, Chi-Tung Cheng,

Ren-Chin Wu5, Yi-Hsiu Chung, Kun-Chun Chiang, Ta-Sen Yeh, Meng-Lun Lu,

Chun-Yu Liu, P. Mu-Hsin Chang, Ming-Han Chen, Chi-Ying F. Huang, Mi. Hsiao,

Ming-Huang Chen, Identification of MALT1 as both a prognostic factor and a

potential therapeutic target of regorafenib in cholangiocarcinoma patients

Oncotarget, **2017**, *8*, 113444-113459.

43. K. W. Yip, X. Mao, P. Y. B. Au, D. W. Hedley, S. Chow, S. Dalili, J. D. Mocanu,

C. Bastianutto, A. Schimmer, Fei-Fei Liu, Benzethonium Chloride: A Novel

Anticancer Agent Identified by Using a Cell-Based Small-Molecule Screen. *Clin.*

Cancer Res., **2006**, *12*, 5557-5569.

44. T. Tamaki, Y. Dong, Y. Ohno, T. Sobue, H. Nishimoto, A. Shibata, The burden of rare cancer in Japan: Application of the RARECARE definition. *Cancer Epidemiology*, **2014**, *38*, 490–495.
45. R. K. Pillai, K. Jayasree, Rare cancers: Challenges & issues, *Indian J. Med. Res.*, **2017**, *145*, 17–27.
46. W. H. Melhuish, A standard fluorescence spectrum for calibrating spectrofluorophotometers. *J. Phys. Chem.*, **1960**, *64*, 762-764.
47. Y. Urano, M. Kamiya, K. Kanda, T. Ueno, K. Hirose, T. Nagano, Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 4888-4894.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科、薬品代謝化学教室、浦野泰照教授に心より深く感謝申し上げます。非常にご多忙な中、研究成果を瞬時に解釈し、鋭く的確な意見を提案していただきました。

極めて貴重なご助言を頂きました、花岡健二郎准教授、上野匡助教、小松徹助教に深く感謝致します。特に小松徹助教からは、研究の方針を決める際や研究に行き詰まった際のご指導など、貴重な時間を割き多くの助言を頂きました。また、辛く悩んだ際にも数々のフォローや激励の言葉に大変勇気付けられました。重ねて深く感謝申し上げます。

阻害剤スクリーニングの実施にあたり、化合物ライブラリーの提供およびご助言を頂きました、東京大学創薬機構、長野哲雄名誉教授、小島宏建副機構長、岡部隆義特任教授に深く感謝申し上げます。

常に励まし、ともに研究を行い、忙しい中で相談相手になってくださった薬品代謝化学教室の全ての皆さまに感謝致します。特に、学生生活の心の支えとなってくれた同期の井上大輝博士、橘棕博士、林健人博士、並びに申ナレ氏、高野陽子氏に深く感謝いたします。

最後に、学生生活を支えてくれた家族に心より感謝致します。

2020年3月

東京大学大学院 薬学系研究科 博士後期課程 薬品代謝化学教室

柳 光一