

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 柳 光一

### [序論]

大規模化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング (HTS) は、細胞の表現型を制御し、疾患を治療する化合物を開発する上で非常に強力な手法である。これら小分子化合物の主な標的は酵素であるが、生細胞内の酵素活性はタンパク質同士の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複雑に制御されているため、その活性を正しく評価するには、*in vitro* よりも生細胞系での評価が望ましいと考えられる<sup>1</sup>。特定の酵素活性を可視化する有機小分子蛍光プローブは、生細胞の代謝活性を評価する優れたツールとして HTS 系の開発に広く用いられてきた。しかしながら、糖やアミノ酸及びその代謝物などの生体内小分子に対してリン酸化や脱炭酸、異性化反応等を行う酵素については、その活性を可視化する蛍光プローブを基質アナログとして開発することは難しく、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。このような活性評価が困難な酵素に対して生細胞系で有効な阻害剤を取得するため、本研究では、①生細胞を用いて、ある代謝経路全体を標的とし、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蛍光検出する、という新たな生細胞ベースの HTS 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 として検出し、その output 量を input と output の間に介在する代謝経路の活性として評価することを考えた (Fig. 1)。この output 量を減少させるような化合物は、標的代謝経路に関わる酵素活性を阻害すると期待される。②について、output の細胞外代謝物と選択的に反応する酸化還元酵素を用いて NAD (P) H や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に変換し、これらと反応して蛍光上昇を示す蛍光プローブを開発することにより *in situ* で選択的に細胞外代謝物を検出することを考えた。このような、①と②を組み合わせる代謝経路を標的として、生細胞系で標的代謝経路に関わる酵素活性を阻害する化合物を取得する HTS 系を Pathway-Oriented Screening (POS) と名付け、本研究ではその実証実験を行った。

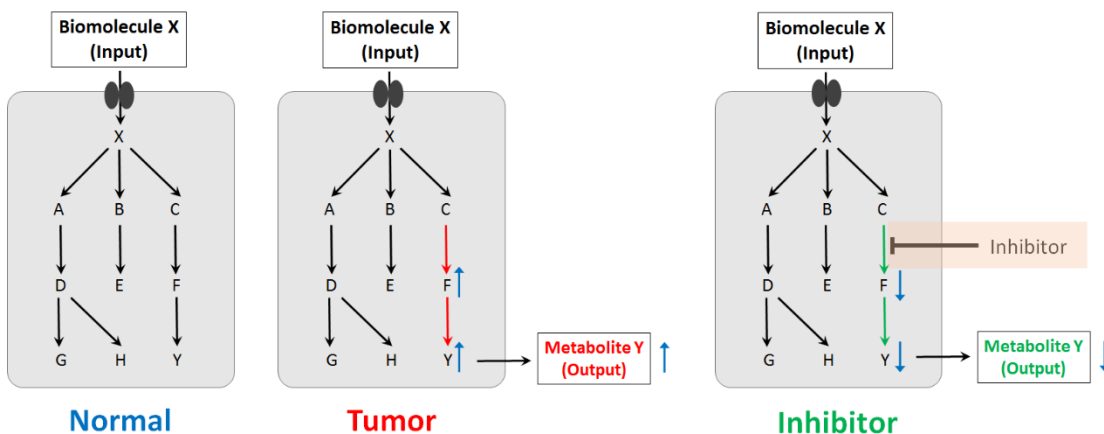
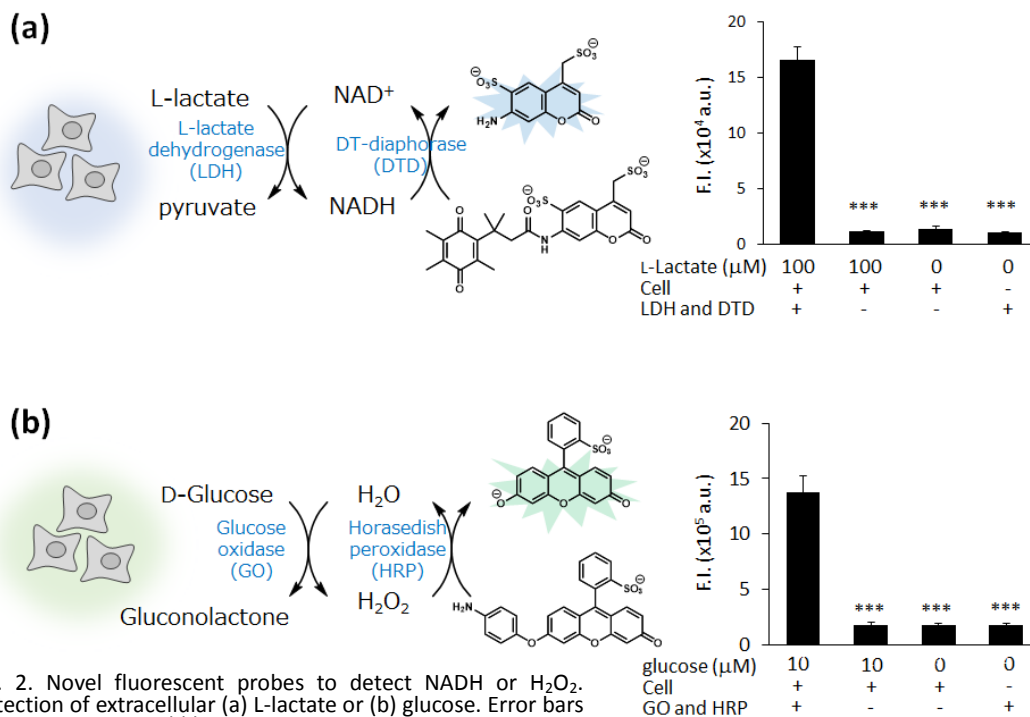


Fig. 1. Schematic view of Pathway-Oriented Screening (POS).

## [本論]

### (A) 細胞外代謝物検出蛍光プローブの開発

カップルドアッセイに用いる蛍光色素が細胞内へ透過し、酸化還元反応を起こすと目的の細胞外代謝物に由来しない蛍光上昇を示すと考えられる。従って、水溶性を高め細胞膜透過性を低下させることで、細胞外に留まり、特定の細胞外代謝物を選択的に蛍光検出することが可能な新規 NADH 検出蛍光プローブおよび H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 検出蛍光プローブを開発した (Fig.2a,2c)。本プローブを用いて、L-lactate、glucose をそれぞれ L-lactate dehydrogenase、glucose oxidase により NADH および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> へ変換することで、細胞共存下においても選択的に検出可能であることが示された (Fig.2b,d)。



### (B) Methylglyoxal (MG) 代謝系阻害剤の探索

開発したアッセイ系を用いてがんが亢進している代謝活性を評価することとし、特に MG 代謝系、アミノ酸代謝系についてこれらを制御して抗がん作用を示す化合物を探索した。MG は解糖系の副生成物として生じる代謝物であるが、反応性の高いジカルボニル構造がタンパクや核酸と反応するため MG は高濃度で細胞死を導くことが知られている。解糖系が亢進しているがんではこれに比して MG の産生も増加すると考えられるが、多くのがんでは、MG を無害な D-lactate へ代謝する MG 代謝系の亢進がその防御に寄与していると考えられている。特に、MG 代謝系の酵素群の活性は肺がんが亢進しており、難治性の肺小細胞がんの創薬標的になりうるということが報告されている<sup>2</sup>。そこで MG を input、D-lactate を output とし、output の D-lactate を Fig.3a に示すカップルドアッセイにより *in situ* で検出する POS 系を構築し、東京大学創薬機構提供の 9600 化合物から MG 代謝系阻害剤を探索した (Fig.3b)。得られたヒット化合物のうち、化合物 1 はがん細胞 (DMS273) で特に強い増殖抑制効果を示し (Fig.3c)、MG 代謝系酵素 glyoxalase1

(GLO1) の代謝物 S-D-lactoylglutathione (SLG) および GLO1 の補因子 glutathione (GSH) の細胞内量を減少させていた (Fig.3d)。化合物 1 は細胞内 GSH を減少させることで MG 代謝系を抑制し、がん選択的に増殖抑制効果を示すことが示唆された (Fig.3e)。

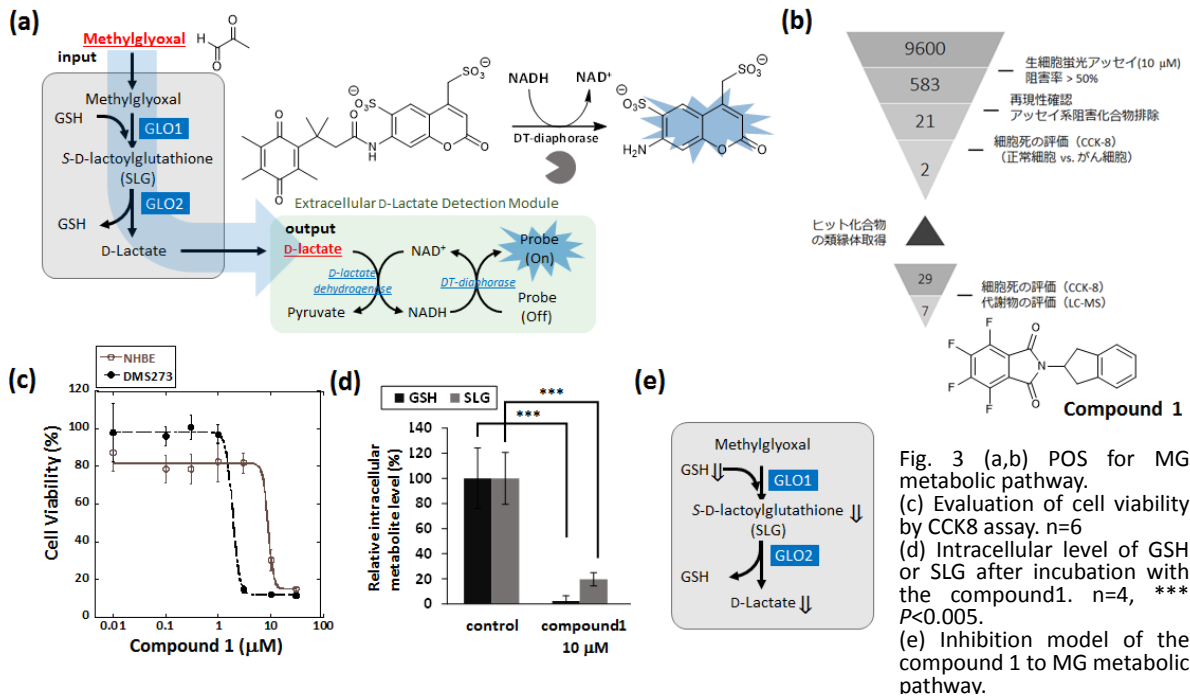


Fig. 3 (a,b) POS for MG metabolic pathway. (c) Evaluation of cell viability by CCK8 assay. n=6 (d) Intracellular level of GSH or SLG after incubation with the compound1. n=4, \*\*\* P<0.005. (e) Inhibition model of the compound 1 to MG metabolic pathway.

### (C) アミノ酸代謝系 (Gln -> Asn) 阻害剤の探索

これまでの検討から適切な input と output を定めることで、がんが亢進している代謝活性を評価可能であることが確かめられた。そこで、本アッセイ系をより広範な代謝活性の評価系へ発展させるため、がんの特徴的な input と output の組み合わせを探索することを可能にする実験系を開発した。特にアミノ酸代謝に着目し、各アミノ酸を input として細胞に添加した後、細胞外に放出された output のアミノ酸を測定することで、正常細胞とがん細胞で違いの見られる input と output の組み合わせを複数見出すことに成功した (Fig.4a)。特に、L-glutamine (Gln) を添加した後、細胞外へ放出される L-asparagine (Asn) の量が正常細胞 (NHBE) と比較してがん細胞 (A549) で増加しており、Gln -> Asn という代謝経路が亢進していると考えられた (Fig.4b)。がんは様々な代謝活性が亢進しているが、その 1 つに、ATP 産生をグルタミン代謝に大きく依存する性質が知られており<sup>3</sup>、これを阻害する化合物は抗がん作用を示すことが期待される。そこで input を L-glutamine、output を L-asparagine として、output の L-asparagine を Fig.4c に示すカップルドアッセイにより蛍光検出する POS 系を構築することで、Gln -> Asn 代謝経路を阻害する化合物を生理活性既知の 1600 化合物のライブラリーから探索した (Fig.4c,d)。得られたヒット化合物のうち、化合物 2 と化合物 3 は Gln -> Asn 代謝経路に関わる代謝物の細胞内量を減少させると共に (Fig.4e)、がん細胞 (A549) に対して強い Viability 抑制効果を示すことが確かめられた (Fig.4f)。

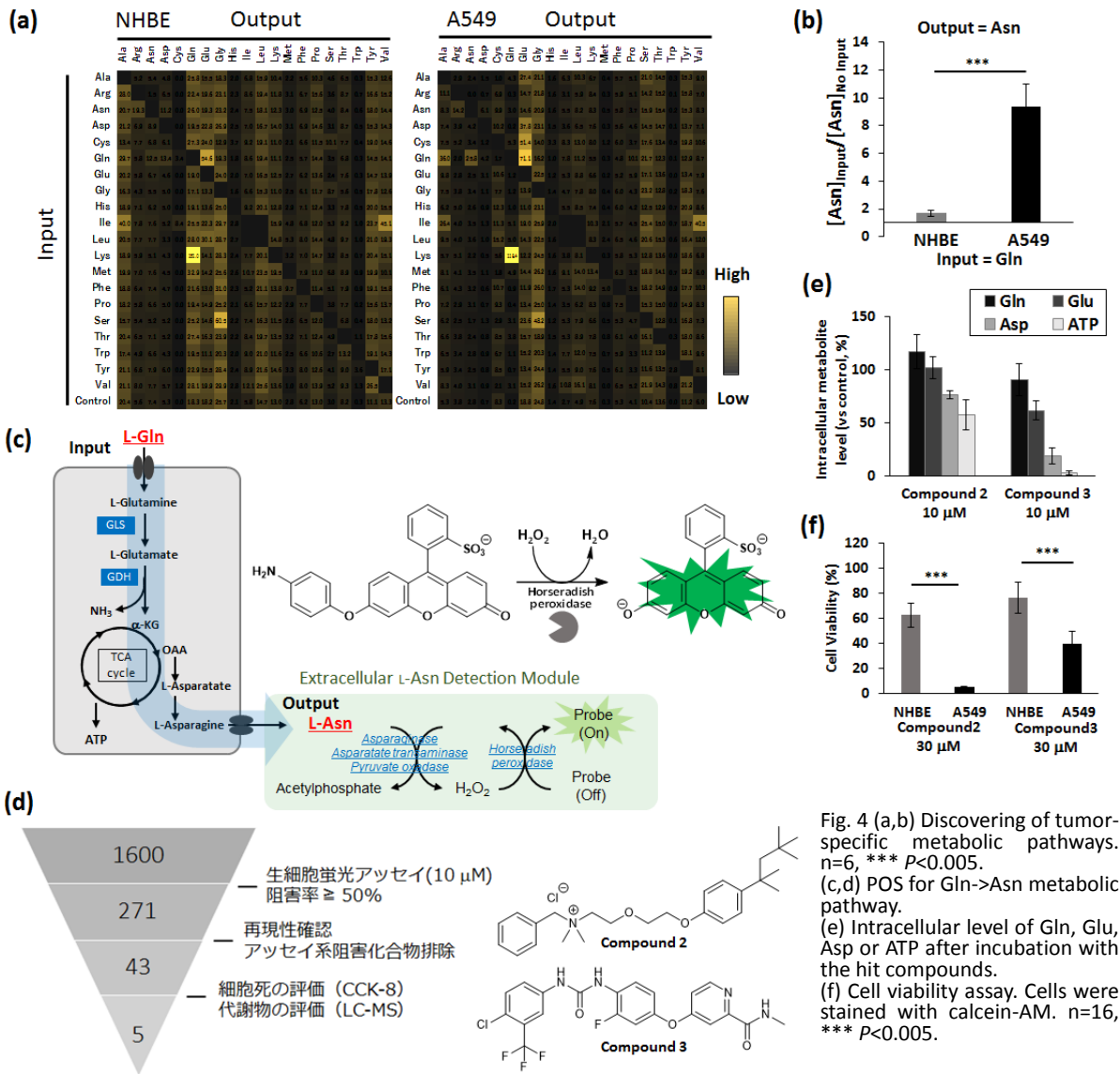


Fig. 4 (a,b) Discovering of tumor-specific metabolic pathways. n=6, \*\*\* P<0.005. (c,d) POS for Gln->Asn metabolic pathway. (e) Intracellular level of Gln, Glu, Asp or ATP after incubation with the hit compounds. (f) Cell viability assay. Cells were stained with calcein-AM. n=16, \*\*\* P<0.005.

## [総括]

代謝活性を評価する新たな生細胞ベースの HTS 系 Pathway-Oriented Screening (POS) 法を開発することに成功し、生細胞系で有効な新規 MG 代謝系阻害剤および Gln -> Asn 代謝経路阻害剤を取得した。これら新規阻害剤はがん細胞に対して有意に強く Viability を抑制することが分かり、新たな代謝活性制御型の抗がん剤候補としての発展が期待される。さらに、POS 法は任意の input と output を選択することで様々な代謝経路について評価可能であり、用いる細胞も遺伝子導入等の特別な処理が必要ないため、高い汎用性が期待される。

## [参考文献]

1. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 130-42.
2. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2513-18.
3. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 829-46.