

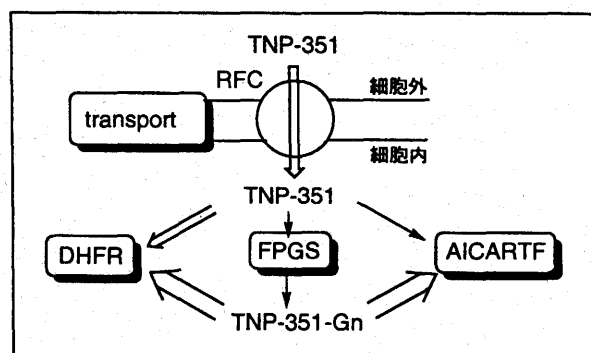
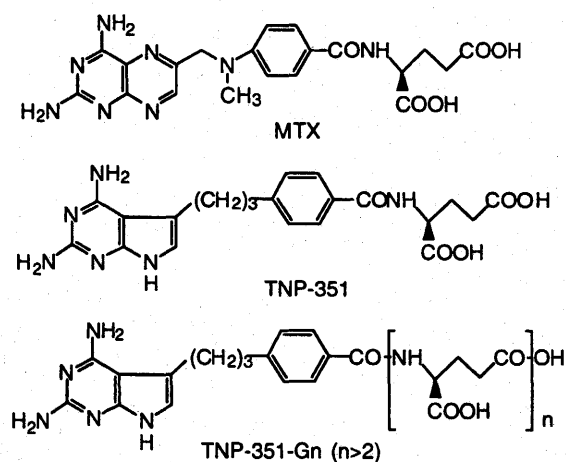
氏 名	伊 藤 文 雄
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 634 号
学位授与の日付	平 成 12 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ピロロ [2,3-d] ピリミジン系葉酸拮抗剤 TNP-351 の作用機序ならびに非グルタメート型葉酸拮抗剤の創製に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 杉 浦 幸 雄 教 授 富 士 薫 教 授 藤 井 信 孝

論 文 内 容 の 要 旨

葉酸補酵素は、ピリミジンおよびプリン生合成系の一炭素導入反応において重要な役割を担っており、葉酸補酵素の代謝系をターゲットとした多くの葉酸拮抗剤が癌化学療法剤として開発されている。1953年に開発されたメトトレキセート (MTX) はジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の阻害剤であり、白血病を中心とした抗腫瘍剤として今日まで臨床の第一線で使用されている。しかしながら MTX は、単独では固形腫瘍にはほとんど効果を示さず、毒性や耐性獲得も大きな問題となってきた。従来のプテリジン環とは異なるピロロ [2,3-d] ピリミジン環を有する新規葉酸拮抗剤 TNP-351 の DHFR 阻害作用は MTX の 1/50 以下と弱いにもかかわらず、抗腫瘍活性は MTX よりも強く、その原因と真の作用機序は不明であった。著者は、TNP-351 の作用機序の解明研究に着手すると共に、MTX-耐性腫瘍に有効な新規葉酸拮抗剤の合成を計画した。

葉酸拮抗剤は、DHFR 以外の酵素阻害、細胞内への取り込み、ポリグルタメート化による細胞内プールが作用発現に深く関与している。そこで、耐性機序の異なる 3 種の MTX-耐性株が確立されている CCRF-CEM ヒトリンパ芽球白血病細胞を用いて作用機序を推測した。添加救済実験の結果、DHFR および AICAR ホルミル基転移酵素 (AICARTF) の阻害が抗腫瘍作用に関与している事が示唆された。さらに MTX-耐性株での増殖阻害作用から、第一標的酵素は DHFR であること、細胞内への取り込みならびにポリグルタメート化が優れていることが示された。それを証明する目的で、葉酸ポリグルタメート合成酵素 (FPGS) の基質反応性ならびに、プリン生合成系の葉酸関連酵素である GAR ホルミル基転移酵素 (GARTF) および AICARTF の阻害活性を測定した。その結果、TNP-351 の FPGS に対する基質反応性は MTX よりも



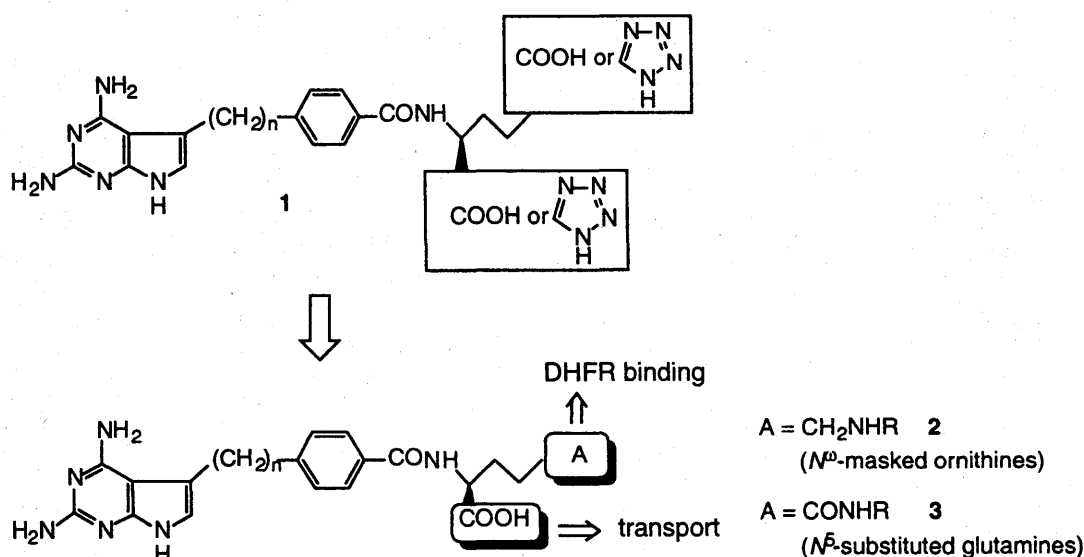
約30倍高く、細胞内で速やかにポリグルタメート体に変換されることを明らかにし、さらに TNP-351 ポリグルタメート体は強力な AICARTF 阻害活性を有する事を見出した。

以上の結果から、TNP-351 は以下のメカニズムで作用していることを明らかにした (図1)。

1. RFC を介して速やかに細胞内に取り込まれる。
2. 細胞内で速やかにポリグルタメート体に変換され、細胞内にプールされる。
3. 生成したポリグルタメート体が DHFR と共に AICARTF をも強く阻害する。

TNP-351 は強い抗腫瘍作用を示すものの、MIX-耐性腫瘍に対しては効果が不十分である。そのため、MTX-耐性腫瘍に有効な新規葉酸拮抗剤の創製を目指した。TNP-351 は細胞内でポリグルタメート化されて酵素阻害増強、細胞内貯留効果により強い抗腫瘍作用を示す。そのためにグルタミン酸部分は活性発現に必須であると考えられていた。しかし著者は、ポリグルタメート体で酵素阻害活性が増強することから、グルタミン酸部分を変換することで DHFR 阻害活性が増強し、MTX-耐性腫瘍をも克服できる新規葉酸拮抗剤が創製できると考えた。

グルタミン酸の酸性基は細胞内取り込みや標的酵素との結合に重要な役割を担っていることから、まず TNP-351 関連化合物において、グルタミン酸の2つのカルボキシル基をそれぞれテトラゾリル基に変換した化合物 (1) を合成し、その生物活性を検討することでそれぞれのカルボキシル基の役割の重要性を明らかにした。その結果、 α -カルボキシル基は細胞内への取り込みに必須であり、 γ -カルボキシル基部分は構造変換することで DHFR との結合を増強できることを見出した。そこで、グルタミン酸部分を N^{ω} -置換オルニチン (2) や N^5 -置換グルタミン (3) に変換した新規非グルタメート型葉酸拮抗剤を分子設計し、その合成および生物活性を検討した。



その結果、いずれのタイプにおいても側鎖置換基 (R) 上に酸性官能基を有する化合物は、細胞内に効率良く取り込まれ、ポリグルタメート化を受けることなしに強力な DHFR 阻害活性を有し、強い細胞増殖阻害活性を示した。さらに FPGS 低下ならびに膜透過低下機序による MTX 耐性株に対して優れた抗腫瘍活性を示すことが確認された。これまで必須と考えられていたグルタミン酸部分を変換することにより MTX-耐性腫瘍に対し交差耐性を示さない新規葉酸拮抗剤を得ることに成功した。

近年、MTX 大量-ロイコボリン救援療法や MTX-5-フルオロウラシル (5-FU) 併用による biochemical modulation の理論的療法により、癌治療における MTX の効果が見直されてきており、MTX の使用が増えるにつれ MTX 耐性腫瘍はますます増加することが予想される。本研究での非グルタメート型葉酸拮抗剤への分子設計は、今後必要となる MTX 耐性腫瘍を克服する薬剤創製において有用な情報を提供するものと考えられる。さらに癌領域以外でも葉酸拮抗剤が有効な、抗菌、抗マラリア、抗リュウマチなどの疾患治療薬開発の上でも有益な知見を提供するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

葉酸補酵素は、核酸生合成において重要な役割を担っており、葉酸補酵素の代謝系を阻害する多くの葉酸拮抗剤が開発されている。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の阻害剤メトトレキサート (MTX) は、単独では固形腫瘍にほとんど効果を示さず、毒性や耐性獲得も大きな問題となっている。ピロロ [2,3-*d*] ピリミジン系葉酸拮抗剤 TNP-351 は、MTX の 1/50 以下の DHFR 阻害活性にもかかわらず、MTX よりも強い抗腫瘍活性を有し、その原因と真の作用機序は不明であった。以下に示すように、本研究の成果は TNP-351 の作用機序を解明すると共に、MTX-耐性腫瘍に有効な新規葉酸拮抗剤の創製に関して重要な興味深い知見を与えた。

葉酸拮抗剤は、標的酵素の阻害、細胞内輸送、ポリグルタメート化が作用発現に深く関与していることから、耐性機序の異なる MTX-耐性株が確立されている CCRF-CEM ヒト白血病細胞を用いて作用機序を検討した。添加救済実験の結果、DHFR および AICAR ホルミル基転移酵素 (AICARTF) が標的酵素として示唆され、MTX-耐性株を用いた検討から第一標的酵素は DHFR であり、細胞内輸送ならびにポリグルタメート化が MTX より優れていることが強く示唆された。さらに、葉酸ポリグルタメート合成酵素 (FPGS) の基質反応性と、GAR ホルミル基転移酵素 (GARTF) と AICARTF の阻害活性を測定した結果、TNP-351 の FPGS に対する基質反応性は MTX よりも約30倍高く、細胞内で速やかにポリグルタメート体に変換されることを明らかにし、さらに TNP-351 ポリグルタメート体は強力な AICARTF 阻害活性を有する、事を見出した。以上の結果から、TNP-351 は、効率よく細胞内に輸送され、細胞内で速やかにポリグルタメート体に変換され、DHFR と共に AICARTF をも強く阻害することで強い抗腫瘍作用を示すことが明らかになった。

ポリグルタメート化を受けなくとも強い DHFR 阻害作用を有し、MTX-耐性腫瘍にも有効な葉酸拮抗剤の創製を目指した。グルタミン酸の酵性基の役割を明らかにする目的で、グルタミン酸のカルボキシル基をそれぞれテトラゾリル基に変換した化合物を合成し、その生物活性を検討した。その結果、 α -カルボキシル基は細胞内輸送に必須であり、 γ -カルボキシル基部分は構造変換することで DHFR との結合を増強できることが強く示唆された。その知見を基に、グルタミン酸部分を N^{ω} -置換オルニチンや N^5 -置換グルタミンに変換した非グルタメート型葉酸拮抗剤を分子設計し、その合成および生物活性を検討した。その結果、側鎖置換基上に酸性官能基を有する化合物は、細胞内に効率良く輸送され、強力な DHFR 阻害活性を有し、強い細胞増殖阻害活性を示した。さらに FPGS 低下ならびに膜透過低下機序の MTX 耐性株に対して交差耐性を示さず優れた抗腫瘍活性を現すことが確認された。

以上、本研究で得られた葉酸拮抗剤に関する成果は、MTX 耐性腫瘍を克服する薬剤創製において極めて有用な情報を提供するものであり、さらに癌領域以外でも葉酸拮抗剤が有効な、抗マalaria、抗リュウマチなどの疾患治療薬開発の上でも有益な知見を提供するものと考えられる。

よって、本論文を博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成12年8月21日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。